

89



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DEL ZINC SOBRE LA PLANARIA Dugesia dorotocephala EXPUESTA AL SEDIMENTO DE LA PRESA IGNACIO RAMIREZ

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

CESIA MONROY ACOSTA



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D.F.

2001

272878



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

HONORABLE JURADO

Presidente

Dr. Homero Hernández Montes

Vocal

M.C. Carlos Perez Muñoz

Secretario

Dr. Francisco Hernández Luis

Primer suplente

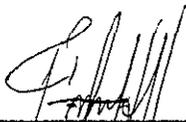
Profa. Sobeida Sánchez Nieto

Segundo suplente

Prof. Elpidio García Ramírez

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Toxicología Acuática del departamento de Farmacia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

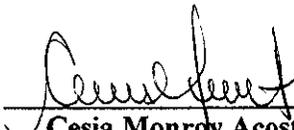
El tema se desarrolló bajo la dirección de la Dra. Laura Martínez Tabche y el Dr. Francisco Hernández Luis.



Dr. Francisco Hernández Luis
Asesor de la tesis



Dra. Laura Martínez Tabche
Supervisor técnico



Cesia Monroy Acosta
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

- **A LA DRA. LAURA MARTÍNEZ.**
Por su gran apoyo durante todo el trayecto del proyecto así como su gran interés personal en el bienestar de todos sus alumnos.
- **AL DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ.**
Por sus contribuciones tan enriquecedoras al proyecto y su apoyo incondicional al mismo.
- **A MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO.**
Por sus enseñanzas en los detalles tan pequeños pero tan importantes para que este proyecto se pudiera realizar.
- **AL DEPTO DE INSTRUMENTACION.**
Por el uso de sus instalaciones para las mediciones realizadas en absorción atómica.
- **A LA Q.F.I. ESTHER OVIEDO BARRERA.**
Por su apoyo en las mediciones realizadas al sedimento y el uso de las instalaciones de su laboratorio.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

Que despues de 25 años ven realizado uno de sus tantos esfuerzos, muchas gracias por las cosas que me han enseñado, los momentos que me han cuidado y el gran amor que me han brindado. A Francisco por la gran paciencia que siempre me transmitio y elemento esencial para el aréa de las ciencias. A Virginia por su inmensa dedicación a ser madre, por los consejos y por los grandes cuidados de la salud que es los más importante en esta vida.

A MI HERMANA DEA

Gracias por la paciencia que me has dado, la sabiduría que me transmites y la gran energía y pasión por la vida que me inyectas.

A MI TÍA TERE

Por los cuidados tan especiales que me brindas y por el gran sentido que le das a la vida. Con tu apoyo diario en las actividades cotidianas logré mucho de lo que en este trabajo se presenta.

A GÉRALD

Por el tiempo de tu vida que me regalas, por el amor y la gran ternura que me brindas. Gracias por estar aquí a mi lado desde hace ya muchos años y aprender a crecer juntos.

A MIS AMIGOS DE LA FACULTAD

Por los grandes y duros momentos, por los esfuerzos que juntos hicimos y por la solidaridad que siempre estuvo presente. Por supuesto por el gran equipo de trabajo que siempre estuvo presente.

A MIS AMIGOS DE LA PREPA

Por seguir conmigo a pesar del tiempo y de los caminos diversos que la vida nos ha llevado. Gracias por retroalimentarme con sus profesiones, sus familias y su vida cotidiana.

A MIS DEMÁS AMIGOS

Por aportarme en cada instante experiencias intensas que incrementan mi desarrollo como ser humano .

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.- ANTECEDENTES	6
1.1.- Las planarias	6
1.1.1.- Características generales	6
1.1.2.- Locomoción	7
1.1.3.- Alimentación y sistema digestivo	8
1.1.4.- Respiración	8
1.1.5.- Excreción	9
1.1.6.- Sistema nervioso y órganos de los sentidos	10
1.1.7.- Reproducción y desarrollo	10
1.1.8.- Importancia ecológica y de estudio	11
1.1.9.- Medios de cultivo	12
1.2.- Zinc	12
1.2.1.- Propiedades físico – químicas	12
1.2.2.- Importancia comercial	13
1.2.3.- Distribución en el medio ambiente	14
1.2.4.- Toxodinámica	16
1.3.- Toxocinética	18
2.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	19
2.1.- Justificación	19
2.2.- Objetivos generales	19
2.3.- Objetivos particulares	19
3.- PARTE EXPERIMENTAL	20
3.1.- Análisis Físicoquímico de los sedimentos	20
3.1.1.- Determinación del porcentaje de materia orgánica.	20

3.1.2.- Determinación de la humedad	21
3.1.3.- Determinación del pH	21
3.1.4.- Determinación del Nitrógeno total.	21
3.1.5.- Análisis granulométrico	22
3.2.- Material Biológico	22
3.3.- Determinación de la toxicidad aguda del Zinc	23
3.3.1.- En el agua	23
3.3.2.- En el sedimento	24
3.4.- Toxicidad subletal	24
3.4.1.- Homogeneizado del tejido	26
3.4.2.- Proteínas	26
3.4.3.- Metalotioneínas	26
3.4.3.1.- Preparación de las membranas de eritrocito humano	26
3.4.3.2.- Medición de las metalotioneínas	27
3.4.4.- Hemocianina	27
3.4.5.- Cuantificación del Zinc	28
3.5.- Calculo del factor de bioconcentración y análisis estadístico	28
4.- RESULTADOS	
4.1.- Características del sedimento	29
4.1.1.- Propiedades fisicoquímicas del sedimento	29
4.2.- Toxicidad aguda del Zinc	30
4.2.1.- Los resultados de la toxicidad aguda del Zinc a las 96 h en el agua	30
4.2.2.- Los resultados de la toxicidad aguda del Zinc a las 96 h en el sistema agua - sedimento	31
4.3.- Toxicidad subletal del Zinc	32
4.3.1.- Proteínas	32
4.3.2.- Cambios en las metalotioneínas	36

4.3.3.- Cambios en la concentración de hemocianina en la planaria	40
4.4.- Contenido del Zinc	44
4.4.1.- En el sedimento	44
4.4.2.- En el agua	48
4.4.3.- En el tejido de la planaria	52
4.5.- Porcentajes totales de captación en el sistema a las 96 horas	55
5.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS	58
6.- CONCLUSIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	66
APÉNDICE	71
1.- Preparación de reactivos	71

PRODUCCIÓN

Hoy en día llegamos a utilizar muchas sustancias que no son de origen natural para poder hacer nuestras necesidades diarias. Desafortunadamente el mal uso de éstas llegan a provocar irregularidades en un sistema natural, en especial en el agua. Al ser este un recurso vital para el hombre, es cada vez más escaso el volumen aprovechable del mismo, debido principalmente a la contaminación existente alrededor de la tierra. Estas irregularidades pueden ser cualquier contaminación nociva del tipo físico, químico y biológico que daña directa o indirectamente al sistema como consecuencia del mal uso de los recursos naturales y de las relaciones irregulares de trabajo que se establecen en las sociedades humanas; otra definición de contaminación es la alteración a partir de un estado normal ya sea en un ambiente terrestre o acuático (Stock, 1981).

La alteración a un sistema puede ser causada por una gran variedad de sustancias como plaguicidas, agentes patógenos, derivados del petróleo, calor, desechos radiactivos, metales, etc. Dentro de esta gran clasificación existen desde luego algunas de mayor interés según sean los daños provocados. Los metales se encuentran en un nivel importante debido a su uso tan antiguo, son probablemente los agentes tóxicos más viejos que se conocen, y su deposición se ve más afectada en los mares que en mares debido a que el arrojado de contaminantes se lleva a cabo principalmente en los ríos (Cervantes, 1999).

El movimiento de los metales por todos los organismos va a estar en función de la cadena alimenticia, de esta depende la cantidad acumulada de un organismo a otro. Dentro de los sistemas agua – sedimento podemos tener varias reacciones, algunas de ellas es la desintoxicación, siendo la conversión de una sustancia a otra de menor toxicidad. También la reducción del efecto puede presentarse por el contacto del agua o sedimento con el xenobiótico el cual se absorbe y se incorpora al organismo, llegando a ocurrir el proceso de bioacumulación. Más aún este efecto puede incrementarse cuando se continua con la cadena alimenticia, así los peces al comer organismos mayores, incorporan a su estructura una mayor cantidad del tóxico, conociéndose este proceso como biomagnificación. Un factor importante que determina la bioconcentración de un xenobiótico es su disponibilidad, la cual a su vez puede ser modificada por las propiedades fisicoquímicas del medio; por ejemplo, el zinc (Zn) incrementa su liberación al acidificarse el medio (Manaham, 1992).

Son diferentes los métodos empleados para establecer modelos de protección ambiental, tanto para agua, sedimento como para los hidrobiontes (animales acuáticos); en líquidos renovables se determinan parámetros químicos de los contaminantes vertidos en las corrientes acuáticas, pero esto no es suficiente para establecer el impacto ambiental en dichas vertientes. Aún cuando la evaluación química del cuerpo de agua es importante, este tipo de determinaciones no otorga información del efecto subletal de las muestras sobre los hidrobiontes (Allen, 1992).

Para medir el impacto de una sustancia en un organismo aislado o en todo un sistema, se llevan a cabo pruebas toxicológicas. Estas son adecuadas para la determinación del grado de contaminación de un lugar. Para peces de agua dulce y otros hidrobiontes se han estandarizado períodos que van desde 4 horas hasta 4 días dependiendo de las condiciones de prueba. Para poder entender la metodología usada se definirán primero algunos conceptos (Mance, 1990):

- Prueba de Toxicidad : Es un estudio donde se utilizan organismos vivos para definir los efectos dañinos de una sustancia o mezcla de ellas bajo condiciones controladas.
- Toxicidad aguda : Es una prueba donde se evalúa una respuesta letal causada por tiempos de exposición cortos (lo más común son 4 días) a concentraciones altas de una determinada sustancia.
- Toxicidad subletal : Es una prueba donde se evalúa los efectos dañinos pero no letales, los períodos de tiempo pueden ser los mismos que en la toxicidad aguda. Casi siempre se utilizan la Concentración Letal cero (CL_0) o el límite oficial permisible.
- Toxicidad crónica : Es una prueba que causa efectos dañinos en los organismos por exposiciones más largas al xenobiótico.

Los estudios de toxicidad crónica, evalúan parámetros a nivel biológico, fisiológico y bioquímico; un ejemplo, puede ser el decremento en la actividad enzimática como el de la catalasa, acetilcolina y la lipasa (Dai, 1997).

De esta manera ha surgido la necesidad de implementar nuevas pruebas que indiquen el estado de salud de un organismo cuando se expone a concentraciones subletales. Un biomarcador se considera cualquier parámetro bioquímico, fisiológico o histológico que puede exhibir un cambio

o resultado de la exposición de un organismo a un xenobiótico o una mezcla de ellos (Bernet,).

De todas las pruebas bioquímicas las más importantes son la cuantificación de proteínas y de hemoglobina. Las proteínas son vitales ya que la mayor parte de los procesos metabólicos se realizan por enzimas. Más aún, dentro de estas moléculas son de especial interés las metaloproteínas, ya que se ha visto que pueden modular la toxicidad de muchos xenobióticos como agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, el cisplatino (Bauman, 1991); además de funcionar como mecanismo de defensa cuando se presenta estrés oxidativo (Iszard, 1995). Su abundancia en organismos acuáticos es principalmente en el hígado, riñón, páncreas y el intestino. Su vida media es de 1 a 4 días dependiendo del metal con el que se coordine (Kägi, 1988). Estas proteínas fueron descubiertas en 1957 por Margoshes y Valle y recibieron su nombre precisamente por la gran cantidad de metales que pueden estimular su producción (Eaton, 1982). Se conocen actualmente cuatro isoformas con un peso molecular que puede ir desde 6000 hasta 7000 Da, y con un 30 % de metal en su estructura (Deng, 1999). De estas isoformas la MT-I y la MT-II están distribuidas en todo el organismo mientras la isoforma MT-III se localiza en las neuronas y la MT-IV se encuentra en el epitelio estratificado (Ono, 1997). Desafortunadamente, estas mismas moléculas en exceso pueden funcionar como nefrotoxinas, pueden causar la proliferación de linfocitos y disminuir la peroxidación de lípidos (Templeton, 1991).

Los invertebrados carecen de sistema circulatorio, por lo que la linfa lo llega a sustituir. La linfa está compuesta por células llamadas eritrocruínas, cianocitos y cianoblastos (Hill, 1980). En estas hemocruínas se llega a sintetizar la hemocianina (Hcy) (Soar, 1978); siendo un pigmento respiratorio que contiene cobre en su centro (Ghiretti, 1973). Su función principal es transportar la mayor cantidad de oxígeno (80 – 95 %) a los tejidos del cuerpo (Redmond, 1955). El gas se llega a combinar con el metal en una proporción 1:2 (Vijayakumari, 1987).

En este trabajo el organismo de estudio será un invertebrado conocido comúnmente como camarón de agua dulce, en especial la especie *Dugesia dorocephala*. Estos animales se encuentran en forma natural en la Presa Ignacio Ramírez (PIR)(Figura 1), siendo animales benthicos (animales que viven

en el fondo de los cuerpos de agua), son de especial importancia por su abundancia en el lugar, de aquí el interés de evaluar el impacto del sedimento en esta área.

La región hidrológica Lerma – Chapala – Santiago constituye el sistema acuático más importante del país, una parte de ésta región se sitúa en el Estado de México, con diferentes afluentes y obras hidráulicas. La presa Ignacio Ramírez se ubica en este estado, a un costado de la población de Santa Catarina Tabernillas, en el municipio de Almoloya de Juárez, al noroeste de Toluca. Es la desembocadura del río La Gavia, alimentado este por otros cuerpos de agua como el río El Salitre, El Muerto, Las Cebollas, San Pedro, El guajolota y El Almoloya (Martínez – Tabche, 1994). El área de la cuenca es de 505 Km² y su capacidad de almacenamiento total es de 93.30 millones de m³/año (INEGI, 1999). Es ésta una región muy activa en el sector agropecuario, de hecho llega a ocupar el tercer lugar en la producción nacional de Carpa y Charal produciendo 1,245,217 ton/año respectivamente y ocupa el segundo lugar en la producción de Carpa con 3,900 ton/año (SEMARNAP,1999).

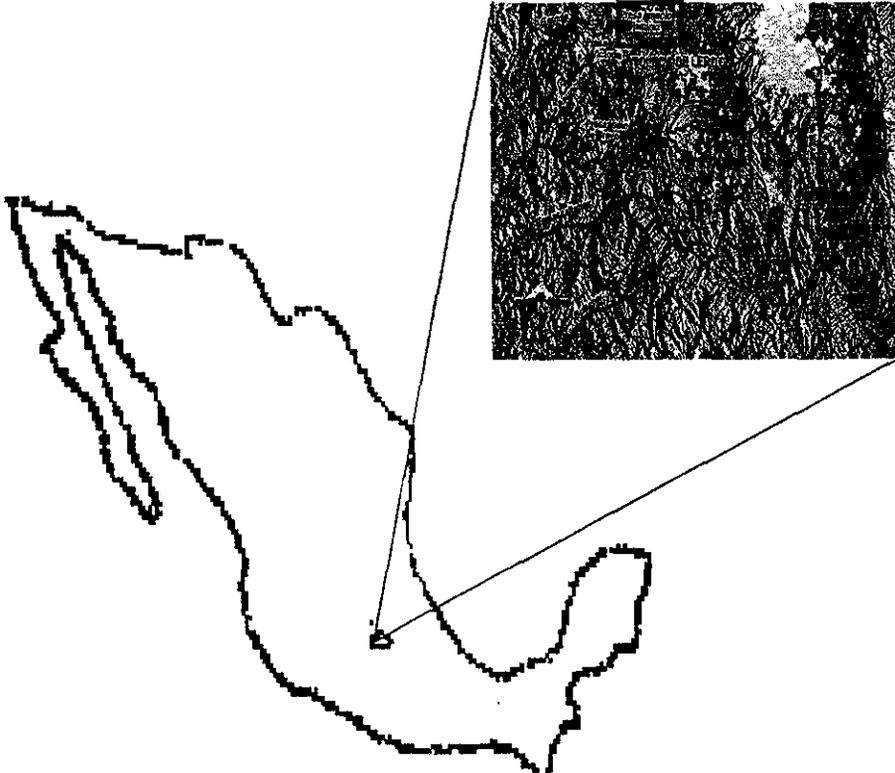


Figura 1.- Presa Ignacio Ramírez,
Estado de México. Fuente INEGI 1999

1.- ANTECEDENTES

Dentro de un ecosistema podemos encontrar una infinidad de organismos donde cada uno de ellos tiene un papel importante para el mantenimiento de la función y de la estructura de dicho sistema. En estas complejas organizaciones podemos encontrar diversos niveles tróficos, de hecho, es en la cadena alimenticia donde se llega a alimentar, reproducir y mantener una especie.

Los animales se dividen primariamente en dos grandes grupos, los vertebrados y los invertebrados que llegan a presentar diferencias significativas con respecto a los primeros. Aún dentro de la segunda clasificación existen animales más complejos que otros, dependiendo de su papel en el sistema. Algunos son consumidores primarios pues se alimentan de algas, los consumidores secundarios, como las planarias (Figura 2), comen tanto plantas como animales pequeños.

1.1.- Las planarias

Las planarias están consideradas dentro de la Clase Turbellaria, del Filo de los Plutehelmintos, del orden de las macroturbellarias, del suborden Tricladida, de la Familia Planariidae, del Género *Dugesia* y la Especie de este estudio será *Dugesia dorotocephala*. En este género se ha visto que existen alrededor de 100 especies y pese a que la mayoría son de agua salada, una pequeña fracción de éstas (alrededor de diez) se describen como habitantes de agua dulce, como la especie de estudio (Remark, 1989).

1.1.1.- Características generales

Todas las formas de planarias de agua dulce son elongadas, lisas y de forma cilíndrica. Generalmente miden de 5 a 30 mm., su cavidad en el cuerpo es gastrovascular, donde se llega a situar un compartimento abierto que tiene ambas funciones de boca y de ano. Ésta se sitúa generalmente en las dos terceras partes anteriores de su cuerpo. Dentro de las planarias se pueden encontrar una inmensidad de colores; los más comunes son los grises, cafés o negros aunque se han observado color olivo, amarillo pardo, rosa y rojo; también se pueden encontrar diversos patrones como rayas, motas o manchas en general (Hymann, 1951).

Si bien algunas especies son pelágicas (animales que se mantienen en la superficie de los cuerpos de agua), la mayor parte de ellas habitan en el fondo de los cuerpos de agua, sobre el sustrato, el lodo, debajo de piedras o entre hierbas (Rieger y Overstreet, 1977).

También son característicos sus ojos presentes en el lado anterior y aunque la mayoría de las especies presentan solo un par, hay algunas que presentan uno o dos pares o ninguno de estos.

Las glándulas epidérmicas y subepidérmicas producen un moco abundante que usualmente recubre al organismo. Entre la dermis y las fibras musculares existen células llamadas parenquima, estas son vacuoladas, azules y húmedas. No tienen un sistema vascular propio así que el transporte de alimentos y gases lo realizan por medio de la difusión a través de la linfa.

2.- Locomoción

Estos organismos no pueden nadar, solamente se desplazan sobre superficies o la película de agua. Su cuerpo está recubierto por un epitelio simple, secretor y ciliado llamado epidermis. Sus movimientos son el producto de la acción de los cilios, que varían de tamaño, situados sobre la capa mucosa, la cual recubre su cuerpo sirviéndoles para adhesión y para cubrir a su presa. Hecho en los costados de la cabeza se sitúan las aurículas, estas les sirven de quimiosensores por lo que les es más fácil detectar el alimento.

Cuando las condiciones no son favorables, como las altas temperaturas o el exceso de comida (debido a que disminuyen la concentración del oxígeno en el agua), las planarias no se activan y permanecen contraídas por momentos que pueden ir desde horas hasta días (Sciencelander, 2000).



Figura 2.- *Dugesia dorotocephala*.
Fuente Platyhelminthes lesson,
2000.

Una diferencia en la estructura de las planarias es en su epidermis dorsal pues esta es más gruesa que la ventral, de hecho es en esta última donde se llegan a producir muchas vesículas secretoras, de gran importancia ya que producen diversas proteínas. Estas vesículas se encuentran en el parenquima (un tejido interno).

1.1.3.- Alimentación y sistema digestivo

Las planarias se pueden alimentar de animales vivos, muertos, plancton o algas. En algunos casos, se ha llegado a observar especies que son muy voraces y llegan a ser exterminadoras en cultivos mixtos; más aún, se han observado especies canibales sobre todo en monocultivos saturados donde existen organismos dañados o de menor volumen.

Cuando estos animales detectan comida se desplazan en esa dirección y se posan sobre el sustrato, en ese momento su faringe sale de la boca y se posa sobre el alimento. Muchas veces este músculo se puede alargar hasta una longitud equivalente a la mitad de todo el cuerpo del organismo. La cavidad gastrovascular se llena entonces de partículas después de 30 ó 80 minutos de haber comido y empieza la digestión con enzimas proteolíticas, excretadas por células glándulares. A continuación la digestión se hace intracelular pues estas partículas de comida son englobadas por células gastrodérmicas ciliadas. Este proceso se realiza en el lumen del animal que está revestido por células largas, vacuoladas, secretoras y fagocíticas que recubren al epitelio llamado gastrodermis. En estos organismos no existe un sistema circulatorio. Los materiales están distribuidos a través de la cavidad gastrovascular (Figura 3).

1.1.4.- Respiración

El intercambio entre el oxígeno y el bióxido de carbono ocurre a través de la epidermis, en los microtubulos y se efectúa por difusión. Estos últimos son más numerosos cuando las planarias se encuentran en un medio con pudrición y con bajas concentraciones de oxígeno disuelto.

De hecho en estos organismos no se encuentran presentes moléculas de hemoglobina con su núcleo metálico de hierro, en este caso es en la hemolinfa donde se transportan los gases y el alimento; la molécula que oxigena a los tejidos se llama hemocianina.

Un papel importante de las planarias es durante la fotosíntesis, ya que el oxígeno liberado durante este proceso es consumido por los organismos, posteriormente éstos contribuyen con dióxido de carbono y compuestos de nitrógeno que son necesarios para el metabolismo de las algas (Hermann, 1977).

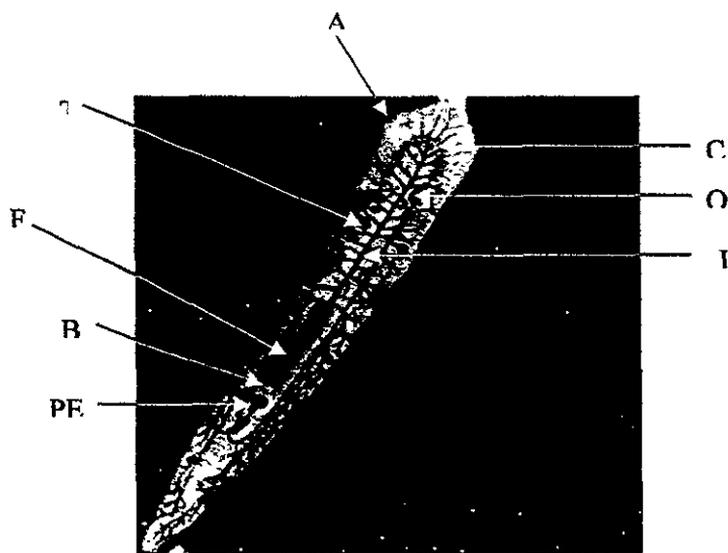


Figura 3.- A, aurícula; B, Boca; C, Cerebro; F, Faringe; I, Intestino; O, Ovario; PE, Pene; T, testículos. Fuente Hermann. 1951.

5.- Excreción

Su sistema de excreción se basa en la existencia de varios ductos a lo largo de todo su cuerpo, ellos son responsables de sustraer todas las partículas que no le son ya útiles al animal para finalmente desembocar en dos vías principales, es decir, las células protonefridas por donde se desechan estos desperdicios, localizadas en el parenquima, a la vez que sirven de osmoreguladores. Así que estas células son las responsables del control del volumen y la composición de los fluidos corporales. Los residuos nitrogenados son acarreados junto con el agua y se eliminan a través de la dermis (Starr, 1992).

1.1.6.- Sistema nervioso y órganos de los sentidos

Poseen un sistema nervioso muy desarrollado. El cerebro consiste en dos o más lóbulos o ganglios, cerca de la parte terminal. Estos tienen a su vez algunas ramificaciones longitudinales que cubren todo su cuerpo, de esta manera hay una abundancia de fibras sensoriales desde el cerebro hasta su parte anterior final.

Sus ojos, llamados también cuerpos refractantes de la luz, son los órganos sensoriales más desarrollados, cada uno de éstos están finamente delineados por células sensitivas que están conectadas a las fibras nerviosas.

1.1.7.- Reproducción y desarrollo

La mayoría de las especies son hermafroditas y se reproducen sexualmente con fertilización interna, en realidad las planarias tienen un elaborado sistema reproductivo. En la superficie ventral se sitúan uno o dos poros genitales, generalmente en la parte posterior de la boca. De manera que dos organismos se aparean e intercambian esperma, este último es guardado por un tiempo en la cavidad principal del animal hasta fertilizar los huevos liberados por los ovarios.

Dentro de las Turberallias existen tres grupos los cuales se dividen según sus mecanismos de reproducción :

1. Las que se reproducen solamente de manera asexual, por fisión. Aunque este es el hábito reproductivo menos común en las planarias. Se ve afectado por factores físicos como la temperatura, pues sólo se lleva a cabo a temperaturas de alrededor de 10 °C, no siendo este el caso con los demás tipos de reproducción.
2. Las que se reproducen solamente de manera sexual, donde se necesita la copulación, cada planaria descarga su esperma en el saco copulatorio de su compañera. La autofecundación está tal vez excluida (Hymann, 1979).
3. Las que tienen la capacidad de reproducirse tanto sexual como asexualmente. Siendo esta la manera más común. En esta categoría los órganos sexuales se desarrollan en el invierno y la primavera temprana, de manera que los huevos son depositados durante Mayo y Junio. Así al cambiar la temperatura en otoño, los órganos sexuales se degeneran y la reproducción es enteramente por fisión.

Los platelmintos son los únicos en el reino animal que poseen una división en los ovarios en dos regiones, una el germario, produce óvulos fértiles, otra, el vitelario, produce células que contienen nutrientes (Marshall, 1985).

En el caso de *Dugesia dorotocephala* se han observado muchas variedades fisiológicas, que raramente se ha observado la reproducción sexual bajo condiciones naturales. Su ciclo de vida se conoce principalmente por los laboratorios de cultivo. Las especies se reproducen asexualmente y viven pocas semanas o meses, muriendo en verano u otoño después de haber producido huevos. A diferencia de las especies reproducidas por fisión, viven más tiempo, cuya vida en un medio de cultivo va desde dos hasta once años. *Dugesia* es de las especies más comunes que se llegan a utilizar en experimentos de regeneración de tejido.

Uno de los factores para la disminución de la tasa de crecimiento poblacional es la sobrepoblación. Esto se ha observado gracias a una sustancia disuelta en el agua más que el hecho de una disminución en el oxígeno disuelto o por el incremento del dióxido de carbono en el agua, siendo estos factores importantes para el crecimiento. Este proceso es interesante ya que las planarias autoregulan su población sin necesidad de hambrunas, enfermedades o depredación.

8.- Importancia ecológica y de estudio

Por su gran densidad geográfica, se considera como el principal rol de las planarias en las interacciones bióticas de las comunidades bénticas (habitantes del fondo del cuerpo de agua), su contribución en la dieta de otros animales. Estos hidrobiontes se pueden encontrar prácticamente en cualquier cuerpo de agua dulce acuática como lagos, estanques y ríos, además de considerarse especies cosmopolitas ya que están distribuidas alrededor del globo terráqueo. En su mayoría se encuentran cerca de la superficie. Las especies más comunes son : *Cura foremanii*, *Dugesia dorotocephala*, *Polycelis coronata*, *Phagocata velata* y *Phagocata Morgani*.

Son especialmente abundantes durante los meses cálidos, especialmente en estanques con agua estancada, con concentraciones de oxígeno mayores al 70 % de saturación (Thorp, 1991). Siendo estos organismos secundarios, algunos de sus depredadores son los nematodos, anélidos y algunos

crustáceos e insectos. Además esta especie se llega a utilizar mucho en el laboratorio para estudiar la regeneración de tejido y para el estudio de comportamiento animal (Phycology, 2000).

1.1.9.- Medios de cultivo

Las planarias se deberán de mantener en agua de dilución que tenga las propiedades más cercanas a la dureza de donde fueron colectadas. El agua se cambiará diariamente para evitar el incremento de la temperatura. El agua de la llave puede ser tóxica. Algunas especies son capaces de resistir condiciones anaerobias por largos períodos de tiempo, pero en realidad la mayoría requiere condiciones altamente aerobias. Bajo condiciones favorables, la división por fisión puede ocurrir cada 5 o 10 días. El límite poblacional es de 2 planarias por 100 mL. de agua (Smith, 1973).

Como son animales fotonegativos, especialmente hacia la luz moderada o fuerte, se llegan a ocultar debajo de objetos, por esto es recomendable colocar rocas u otros objetos de manera que se lleguen a fomentar las sombras en las peceras. De igual manera el contenedor deberá de estar cubierto totalmente.

Cuando son cultivadas en el laboratorio, se deben de alimentar de una a tres veces a la semana con carne fresca (especialmente con hígado de res). Después de 2 ó 3 h se retirará el exceso de comida. Pueden incluso estar sin alimento por meses pero su cuerpo se va reduciendo hasta 1/300 de su tamaño original y se simplifica en la estructura. También se ha observado la ausencia de reproducción durante este período de hambruna.

Pese a la alta capacidad de regeneración de estos animales. son muy delicados y cuando se llegan a manejar bruscamente en el laboratorio, fácilmente se pueden romper o causar alguna irregularidad en su cuerpo.

1.2.- Zinc

1.2.1.- Propiedades físico – químicas

El Zn es un metal suave blanquiazul, que se solidifica en cristales hexagonales, pertenece al grupo IIB de la Tabla Periódica de los Elementos, su número atómico es el 30 y su masa atómica es

5.38. su densidad de 7.14 g/cm³. Su punto de fusión es de 419.58 °C y su punto de ebullición es de 907 °C. En su forma natural este compuesto de cinco isótopos estables, ocho radioactivos y 2 isótopos.

Su estado de oxidación es +2 y tiene una tendencia fuerte a reaccionar con compuestos orgánicos, alcalinos (formando zincatos) e inorgánicos. Se presenta como franklinita (ZnO) o gambita (Zn₂Al₂O₄) siendo ambos estables al aire, aunque se llegan a oxidar y se recubren de una capa de óxido de carbono (Bucavari, 1990).

2.- Importancia comercial

Este metal se ha venido usando tanto en aleaciones como en lociones medicinales desde tiempos anteriores a la era cristiana. En el siglo cuarto de esta era, se empezaba ya a usar para la producción del latón. Hoy en día su producción es del mismo orden de magnitud que el cobre, el aluminio o el plomo.

Uno de los cinturones mineros más importantes del mundo está localizado en territorio estadounidense y va desde el sur de Arizona hasta la parte central de México, con una extensión de 61,000 km² de áreas y ha sido explotado desde hace 400 años. La producción durante 1999 de esta región ascendió a 5.12 millones de toneladas (Biz, 2000).

En la naturaleza, ocurre en la mayoría de los minerales con una concentración media de 70 ppm/kg. Su uso principal radica en la protección del acero por el método de la galvanización, la mayor ventaja es la pérdida de hasta un 20 % del metal durante el proceso; también se llega a utilizar en aleaciones con otros metales; como polvo (para pigmento o agente reductor en reacciones químicas); como óxido de zinc (en productos farmacéuticos como ungüentos), en la industria de la goma, en la industria de la pintura, en el papel de fotocopiadoras, en pinturas, en vidrios, lubricantes, en la fabricación del rayón y otros productos (Giesler, 1983).

Las emisiones antropogénicas del metal en la forma Zn²⁺, emitidas a la atmósfera se calculan en un total de 8 400 000 t/año, comparadas con las emisiones naturales de los volcanes y polvo en general

que es de 360 000 t/año (Galloway, 1982). Las principales fuentes de contaminación son los efluentes industriales y las emisiones en forma de fino polvo.

1.2.3.- Distribución en el medio ambiente

a) Suelos

La concentración del Zn^{2+} en suelos contaminados van de 10 a 300 $\mu\text{g/g}$, encontrándose un promedio de 20 $\mu\text{g/g}$ (Merian, 1991). Los niveles en los diferentes depósitos varían según la actividad humana y por el valor del pH predominante en el suelo. En la Ciudad de México se ha observado, en la Sierra del Ajusco, niveles desde 35.1 hasta 95.2 $\mu\text{g/g}$ (Quiroz, 1999).

Algunas de las técnicas propuestas para limpiar suelos contaminados es lavarlos con soluciones de Na_2EDTA y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, en estos tratamientos se ha visto que se puede eliminar hasta un 25 o 30 % del metal presente (Albumaizar, 1999).

b) Agua

En los océanos se estima una concentración de entre 0.003 a 0.6 $\mu\text{g/L}$ en forma natural. Por el contrario los depósitos de agua dulce, especialmente en los ríos, son frecuentemente contaminados por efluentes y desechos sólidos de industrias. En las superficies de los cuerpos de agua, este metal se puede llegar a unir a arcillas o llega a precipitar con óxidos de Manganeso o Hierro.

Para consumo humano se estableció el límite de 200 $\mu\text{g/L}$ (EPA, 1980). Sin embargo para 1984 el límite permisible para consumo humano según la OMS era de 50 $\mu\text{g/L}$. En algunos lugares contaminados como el Río Ebro en España se han encontrado concentraciones desde 8.20 hasta 325 $\mu\text{g/L}$ disueltos en el agua en diversos sitios rastreados (Ramos, 1999).

Este metal se comporta en solubilidad muy parecido al calcio. Se llega a encontrar generalmente en concentraciones de 0.05 - 1 $\mu\text{g/L}$ en cuerpos de agua, su exceso llega a ocasionar un efecto astringente, por lo que el valor máximo para humanos es de 5 $\mu\text{g/L}$. Algunos de sus compuestos llegan a formar óxidos de zinc solubles en pH de 7 a 9 mientras que a un pH superior al 10 predomina el hidróxido de zinc (Kemmer, 1979).

Animales y plantas

El contenido en plantas varía mucho según la especie, la estación del año, el suelo de cultivo y el origen del agua de irrigación. Se ha estimado que el contenido normal en plantas varía de 15 hasta 100 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (Travieso, 1999).

Por otro lado, se sabe que una buena fuente de obtención del metal en la dieta es a través de carne (que posee de 20 – 60 $\mu\text{g/g}$ en peso húmedo) y pescado (15 $\mu\text{g/g}$ de peso húmedo). En otros tipos de alimentos, el contenido es muy variable, los vegetales y los cereales contienen alrededor de 10 – 60 $\mu\text{g/g}$ de peso húmedo (López, 1999).

En cuanto a los organismos se han reportado ya especies de interés comercial, destinados al consumo humano con concentraciones muy elevadas del metal, estos organismos se llegan a encontrar en zonas contaminadas, un ejemplo es el camarón *Xiphopenaeus kroyeri*, consumido en Brasil donde se observó concentraciones desde 25 hasta 171 $\mu\text{g/g}$ de tejido húmedo (Mantelatto, 1999).

Humanos

En el hombre este metal se llega a encontrar prácticamente en todos los tejidos y fluidos corporales, de hecho ocupa el segundo lugar de abundancia en el cuerpo de los elementos de transición, después del hierro. Encontrándose bajo condiciones fisiológicas en su forma dicatiónica (Cu^{2+}) (Kaim, 1994).

Algunos desordenes corporales se deben a la deficiencia del metal. En un individuo de aproximadamente 70 kg se estima que posee un total de 2300mg, siendo el músculo y los huesos el principal reservorio (62.5 y 28.5 % respectivamente), seguido del hígado (1.8 %). Se conocen más de 200 proteínas, de las cuales cerca de 70 son enzimas, algunos ejemplos de estas últimas son la anhidrasa carbonica, carboxipeptidasa y la alcohol deshidrogenasa, sin olvidar su papel fundamental en el crecimiento (Lindeman, 1980). Otras actividades fundamentales se encuentran en la estabilización de la estructura cuaternaria de algunas enzimas, y en la secreción de hormonas como la testosterona (McDowell, 1992). En la etapa fetal el metal llega al infante por medio de la placenta y el tracto gastrointestinal está todavía inmaduro este no se llega a absorber y esta puede

ser una de las razones por las cuales algunos bebés prematuros (25 – 30 semanas de gestación) nacen con deficiencia del metal, produciendo así problemas como depresión del sistema inmunológico (Prasad, 1993). Otros problemas causados por la falta del metal son problemas cardíacos los cuales provocan problemas en la presión sanguínea (Brown, 1987). Sin embargo por su exceso también se han visto procesos interesantes como los que se mencionan a continuación.

1.2.4.- Toxodinámica

En los invertebrados que viven en zonas industriales donde los sistemas están alterados, la biodisponibilidad de los contaminantes aumenta considerablemente (Krishnamurthy, 1992). Estos organismos, desde el punto de vista fisiológico, pueden evitar la intoxicación por metales reteniéndolos en una forma inactiva, en compartimentos intracelulares o por la excreción de metales asimilados (Kramarz, 1999). En algunos peces se ha observado que su exposición en aguas contaminadas con Zn provoquen un cambio en la estructura de las branquias y como resultado dificulten el intercambio gaseoso (Bianchini, 1999).

En el humano sus efectos tóxicos son muy diversos y se han llegado a reportar casos de intoxicación ya sea por inhalación o ingestión directa, ejemplos de esto son los causados por alimentos ácidos que se llegan a guardar en recipientes galvanizados (Koren, 1991). Por inhalación ocupacional en forma de óxido de zinc también se han reportado casos con los síntomas de tos constante, fiebre, náuseas, fatiga y pérdida de la tonalidad muscular, reportándose en algunos casos edema pulmonar y neumonitis (Berglind, 1984).

El consumo diario superior a los 2 g llega a producir emesis y corrosión gastrointestinal. Un posible tratamiento en contra de la intoxicación es el uso de un quelante como el EDTA, ya que se ha visto que normaliza los niveles del tóxico pero no se ha llegado a estandarizar como antídoto debido a la poca evidencia clínica (Barceloux, 1999).

A pH fisiológico llega a polarizar sustancias, incluyendo al agua (Coleman, 1998). Dada su configuración electrónica, prefiere números de coordinación bajos, al unirse a enzimas estas últimas serán las que determinen la geometría de coordinación, siendo generalmente en forma de tetraedro, por tratarse de un orbital tipo d (Kendrick, 1992).

En enzimas claves como la anhidrasa carbónica (que llega a transformar el dióxido de carbono en carbonato ácido en presencia de agua), el metal es fundamental ya que no se podría dar a cabo la reacción, de esta manera la enzima no podría realizar su función. En otras enzimas como la fosfatasa alcalina y la aldolasa tiene un papel parecido. También acelera las reacciones de manera que los procesos bioquímicos como la fotosíntesis, respiración y control del pH sean mucho más eficientes.

A nivel genético, juega un papel importante en el crecimiento y está presente en los órganos reproductivos. Desde 1980 se han estudiado unas proteínas que reconocen la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN), sirven para la transcripción del mismo. Estas contienen residuos de aproximadamente 30 aminoácidos reflejando así coordinación con el metal, por esto se les ha llamado dedos de Zn. De hecho, el 1 % del ADN humano se codifica con estas moléculas (Kaim, 1994).

En complementos alimenticios de 50 mg/día disminuyen el colesterol-HDL en varones adultos, pero si se toma por más de un período de 5 meses puede causar irritación gastrointestinal y náuseas (Maham, 1995). La dosis mínima para humanos del $ZnCl_2$ se ha estimado de 50 mg/kg de peso mientras que para el $ZnSO_4$ es de 106 mg/kg de peso (Merian, 1991).

Se ha visto una correlación entre la ingestión prolongada del metal y el desarrollo de cáncer gástrico en humanos, además en cultivos de linfocitos humanos expuestos al xenobiótico se incrementa el número de células con fragmentación cromosomal, diploidía y dicentrismo (Chang, 1996).

En el cuerpo se llegan a presentar interacciones entre varias sustancias, se ha encontrado evidencia de un efecto antagónico débil si se llega a administrar con níquel, así en los casos de carcinogénesis se puede lograr latencia tumoral. De igual manera si se llega a administrar con cadmio, protegerá contra la necrosis testicular enfermedad producida solo por este metal. Esta protección se cree posible ya que el Zn al ingresar al cuerpo empieza a producir metalotioneínas, concomitantemente éstas llegan a secuestrar los metales carcinogénicos ya antes mencionados (Sulkes, 1990).

1.3.- Toxocinética

a) Absorción

Se absorbe principalmente en el intestino, el primer paso consiste en su transferencia del lumen del intestino a la mucosa celular por un acarreador que parece transportar a una forma quelante (McDowell, 1992). Su absorción en la mucosa intestinal está regulada aparentemente por una proteína, sintetizada en el hígado, llamada metalotioneína. Ésta síntesis está influenciada tanto por la concentración del metal en el plasma como la ingestión de este por la dieta.

Algunas sustancias aumentan su absorción como la caseína, aceites vegetales y agentes quelantes (EDTA); otras llegan a disminuir su absorción como el fósforo, cobre, cadmio y cromo.

b) Distribución

Una vez en el plasma, se distribuye en dos grandes fracciones. Dos terceras partes se unen a la albúmina para después ser captados por los tejidos y el resto se unen a la α -2-macroglobulina (Merian, 1991).

Los principales lugares de depósito en el cuerpo son en los huesos y el Sistema Nervioso Central, siendo este un proceso relativamente lento. Los tejidos donde se llega a acumular es principalmente en el páncreas, el hígado y el riñón. De hecho, el principal reservorio es en las metalotioneínas distribuidas por todo el cuerpo según las necesidades metabólicas. En forma intracelular, este metal se encuentra en un 80 % en el citosol y solamente el 20 % restante está en la parte celular.

c) Excreción

La principal vía excretora es a través de las heces, solo una pequeña fracción se elimina por la orina, unido a aminoácidos y porfirinas. Por la leche materna también se llega a secretar. En adultos, de una toma diaria de 10 a 15 mg del metal, el 90 % se desecha por las heces.

- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

1.- Justificación

Debido al extenso uso de los metales en las grandes industrias, su descarga se realiza principalmente en cuerpos de agua dulce, como las corrientes de los ríos y lagos, de manera que los contaminantes pueden llegar a cualquier parte del mundo.

El siguiente trabajo se realizó para comprobar el grado de contaminación presente en el lugar de estudio, esto es de suma importancia por la ubicación de la presa y por ser fuente bastecedora de alimentos y agua a las poblaciones cercanas.

2.- Objetivo general

➤ Evaluar la toxicidad y la capacidad de bioconcentración del Zn^{2+} por la planaria *Dugesia dorotocephala*, como ejemplo de la fauna que habita en el sedimento de la presa Ignacio Ramírez (PIR).

3.- Objetivos particulares

- Caracterizar las propiedades físico – químicas del sedimento de la (PIR).
- Evaluar la toxicidad aguda del Zn^{2+} con y sin sedimento en la planaria en un sistema de flujo continuo.
- Evaluar la toxicidad subletal del Zn^{2+} sembrado en sedimento natural (de la PIR) en la planaria en sistemas de flujo continuo.
- Evaluar el impacto del Zn^{2+} en sedimentos naturales y en planarias en un sistema de flujo continuo.
- Establecer los niveles no tóxicos del Zn^{2+} para la planaria en un sistema de flujo continuo.

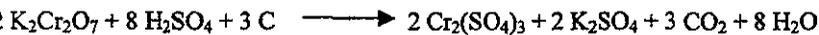
3.- PARTE EXPERIMENTAL

3.1.- Análisis Físicoquímico de los sedimentos

3.1.1.- Determinación del porcentaje de materia orgánica.

Se tomó sedimento del mismo lugar que se colectaron los organismos, siendo este donde desemboca la presa. Esta prueba se realizó según el método de Wakley y Black (Aguilar, 1991). Como primer paso se cernió el sedimento en una malla No. 50; se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL del tamizado y se agregaron 10 mL de una solución que contiene 1 N de K_2CrO_7 y 20 mL de H_2SO_4 concentrado, se agitó la mezcla y se empezó la digestión sobre una parrilla a 70 °C. Después de 30 min se agregaron 200 mL de agua desionizada, 10 mL de H_3PO_4 concentrado y 1 mL de indicador de Difetilamina. Posteriormente, la mezcla resultante fue valorada con una solución que contiene 1 N de $FeSO_4$ hasta obtener el vire de color. La riqueza de materia orgánica en el sedimento se estableció según los parámetros presentados en la Tabla 1.

Las reacciones que se efectúan son las siguientes :



Los calculos se realizaron de la siguiente manera :

$$\% \text{ Carbono orgánico} = \frac{(V_1 - V_2) N}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

V_1 = Volumen del sulfato ferroso para el testigo

V_2 = Volumen del sulfato ferroso para la muestra

N = Normalidad del sulfato ferroso

Tabla 1.- Clasificación de los suelos en función de su contenido de materia orgánica*

% Materia orgánica	Interpretación
0.00 – 0.25	Extremadamente pobre
0.26 – 0.50	Muy pobre
0.51 – 1.00	Pobre
1.01 – 2.00	Mediano
2.01 – 3.00	Rico
3.01 – 4.00	Muy rico
Más de 4.0	Extremadamente rico

*Nava, 1996

3.- Determinación de la humedad

Para realizar la prueba se secó el sedimento al aire como parte de los preparativos a la muestra. Se colocaron 10 g en una estufa Riossa a una temperatura de 110 °C y se registró el peso durante 24 h hasta obtener un peso constante. Posteriormente se calculó el contenido de la humedad en base a la diferencia del peso del pesafiltro vacío y lleno con la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad} = (\text{Peso del sedimento húmedo} - \text{peso del sedimento seco}) \times 100$$

4.- Determinación del pH

Se tomaron 50 g del sedimento, previamente secados al aire y se vertió en un vaso de precipitados de 250 mL adicionando 100 mL de agua desionizada, se agitó el sistema durante 30 minutos y se dejó reposar otros 30 min más para dejar sedimentar el sistema, posteriormente se leyó el pH del sobrenadante en un potenciómetro Conductronic modelo pH120 a 20 °C ajustando previamente con dos soluciones amortiguadoras estándar de pH 4 y 7.

5.- Determinación del Nitrógeno total.

Como en el sedimento se presentan tanto partículas orgánicas como inorgánicas, se analizaron ambas formas.

Se colocaron 3 g de la muestra en un papel filtro, se envolvieron y se depositaron en un matraz Kjeldahl, posteriormente se adicionaron 10 g de la mezcla digestora (ver glosario) y 10 mL de H₂SO₄ concentrado. Se empezó la digestión y se calentó hasta que la solución presentó una apariencia total y un ligero color verdoso. Después de realizado este proceso, la mezcla se diluyó

con 200 mL de agua destilada, le agregaron granallas de Zn y perlas de vidrio y se empezó la destilación. El destilado se recogió en un matraz Erlenmeyer que contenía 50 mL de ácido Bórico al 4 % y 1 mL del indicador de Wesselow. Posteriormente se le agregaron 150 mL de una solución de NaOH al 45 % y el amoniaco desprendido se tituló con HCl 0.1N hasta notar un cambio de color. Simultaneamente se desarrollaron blancos siguiendo el mismo procedimiento en ausencia de la muestra.

Para calcular el % de nitrógeno se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ nitrógeno} = \frac{(M - B) \times N \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

Peso de la muestra

M = mL de HCl consumidos por la muestra

B = mL de HCl consumidos por el blanco

N = Normalidad del HCl

3.1.5.- Análisis granulométrico

100 g de sedimento se secaron en la estufa Riossa a 80 °C por 24 h antes de tamizar. Se tamizó sucesivamente a través de mallas del No. estándar 200 (0.0625 mm), 140 (0.088 mm), 100 (0.125 mm), 80 (0.177 mm), 50 (0.35 mm), 30 (0.5 mm) y 10 (2 mm) las cuales se agitaron durante 15 min en cada caso. Después de cada caso el sedimento obtenido fue pesado (Wenworth, 1970).

3.2.- Material Biológico

Las planarias se obtuvieron de la presa Ignacio Ramírez, se trasladaron en condiciones de aereación constante, temperatura de entre 18 – 24 °C con agua y sedimento del lugar de la colecta. Una vez en el laboratorio, se mantuvieron en peceras de vidrio de 40 mL, bajo las condiciones mostradas en la Tabla 2. Estas condiciones fueron establecidas previamente (Martínez-Tabche, 1997). Las planarias se mantuvieron en estas condiciones por lo menos una semana antes de someterlos a las pruebas de toxicidad ya sea del tipo agudo o subletal, para evitar tener un factor de variabilidad más que alteren los resultados.

Tabla 2.- Condiciones de mantenimiento de las planarias en el laboratorio.

Condición	Requerimientos
Temperatura	18 – 22 °C
Agua reconstituida	Agua semidura
pH	7.0 – 7.5
Alimento	Hígado de res 2 veces por semana
Aereación	24 h
Iluminación	16 h de luz y 8 h de oscuridad (de las 22 a las 6 h del día siguiente)

Determinación de la toxicidad aguda del Zinc.

1.- En el agua

se realizó la determinación de la CL₅₀ en las condiciones mostradas en la tabla siguiente.

Tabla 3.- Condiciones del bioensayo para medir la toxicidad aguda en el agua de Zinc.

Condición	Parametros
Volumen de los recipientes de prueba	100 mL
Volumen de prueba	80 mL
No. de concentraciones ensayadas	5 más el testigo
No. de replicas por concentración	3
No. de organismos por prueba	15
Temperatura	18 – 20 °C
Agua de dilución	Agua semidura
Iluminación	Fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad (de las 22 a las 6 h del día siguiente)
Duración del bioensayo	96 h
Respuesta evaluada	Inmovilización (mortalidad)
Tipo de ensayo	Estático, sin renovación del medio

Las concentraciones utilizadas fueron de 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 y 100.0 ppm de Zn a partir de sulfato heptahidratada. Los organismos se mantuvieron en ayuno 24 h previas a la prueba (Berber, 1991). Para determinar el valor de la CL₅₀ se utilizó el programa *Montpellier, Fevrier* 1997, el cual se basa en las unidades probitas.

3.3.2.- En el sedimento

Se diseñó un sistema que fuera dinámico, de manera que cumpliera con la condiciones de la tabla enseguida presentada.

Tabla 4.- Condiciones del bioensayo para medir la toxicidad aguda en presencia del sedimento de Zinc.

Condición	Parámetros
Volumen de los recipientes de prueba	1500 mL
Volumen de prueba	300 g sedimento / 1200 mL de agua
No. de concentraciones ensayadas	5 más el testigo
No. de replicas por concentración	3
No. de organismos por replica	10
Temperatura	18 – 20 °C
Agua de dilución	Agua semidura
Iluminación	Fotoperíodo 16 h luz y 8 h oscuridad (de las 22 a las 6 h del día siguiente)
Duración del bioensayo	96 h
Respuesta evaluada	Inmovilización (mortalidad)
Tipo de ensayo	Dinámico sin renovación del alimento y de la solución de prueba.

Las concentraciones utilizadas fueron de 10.00, 11.22, 12.58, 14.12 y 15.84 ppm a partir del sulfato heptahidratado. Los animales se dejaron en ayuno 24 h antes del experimento. Para el ensayo testigo se utilizó sedimento artificial, preparado de la siguiente manera: arena, caolinita y materia orgánica (estiércol esterilizado de vaca) en proporción 70:25:5, respectivamente. Se midió la mortalidad de los organismos y se obtuvo la CL_{50} en el programa de computación antes mencionado. Cabe mencionar que como preparativos se incorporó la solución con el tóxico y se dejó llegar al equilibrio (después de 3.5 h), además se conservó la proporción de sedimento – agua (1:4) siendo está la condición más apegada a la realidad de la PIR.

3.4.- Toxicidad subletal

En base a los resultados de la toxicidad aguda se determinaron las concentraciones para este ensayo. Se probaron seis concentraciones de prueba en un intervalo entre la concentración del metal encontrado en el sedimento (0.1296 ppm Zn) y la CL_0 en el sedimento (4.4289 ppm Zn). Las

concentraciones utilizadas fueron las siguientes : 0.1296, 0.2592, 0.5172, 1.5356, 3.0640, 4.4289 Zn a partir de la sal ya antes mencionada.

El sistema agua – sedimento se dejó llegar al equilibrio y se colocaron los organismos, para 4) estos se conservaron en ayuno 24 h antes de las pruebas, así también durante las 96 h de duración del experimento no se les alimentó. Transcurrido este tiempo se procedió a cuantificar la concentración de proteínas totales, metalotioneínas, hemocianina y Zn en los organismos, además Zn presente en el agua y el sedimento del sistema.

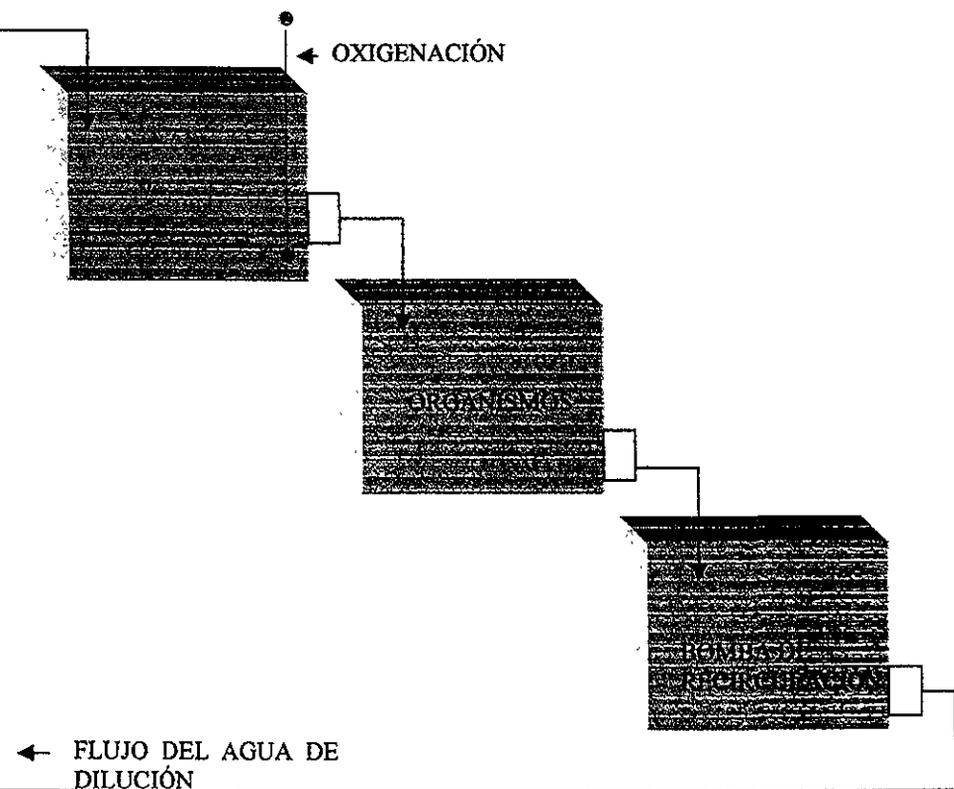


Figura 4.- Sistema de flujo continuo utilizado en las pruebas de toxicidad.

3.4.1.- Homogeneizado del tejido

Se pesaron 0.5 g de tejido de planaria y se suspendieron en 20 mL de una solución amortiguadora de tris pH 7; la mezcla se mantuvo en un baño de hielo durante todo el procedimiento. A continuación se homogeneizó en el aparato Stir – R modelo S63C, en ciclos de 15 seg de agitación y 45 seg de descanso, por 3 min. El sobrenadante se centrifugó en el instrumento Hermle modelo Z360K a 12 800 rpm, 15 min a – 5 °C. Para las pruebas bioquímicas se trabajó con el sobrenadante.

3.4.2.- Proteínas

Se realizó en base al método de Bradford (Bradford, 1976). Se tomaron 25 μ L del sobrenadante, se les agregaron 75 μ L de agua deionizada y 2.5 mL del reactivo de Bradford. Se agitaron los tubos, se dejaron reposar por 5 min y a continuación, se determinó la absorbancia a 595 nm. Para la curva patrón se utilizaron los datos presentados en la siguiente tabla.

Tabla 5.- Curva patrón para la prueba de las proteínas.

Tubo	Albumina (μ L)*	Agua deionizada (μ L)
1	10	90
2	25	75
3	50	50
4	75	25
5	100	0
Blanco	0	100

* De una solución de 1000 ppm (1000 μ g/mL)

3.4.3.- Metalotioneínas

Este método se basa en la determinación indirecta de las metalotioneínas por medio de la unión de plata en condiciones extremas (Scheuhammer, 1986).

3.4.3.1.- Preparación de membranas de eritrocito humano.

Se colocaron 2 mL de sangre de humano de 25 años, en un matraz volumétrico de 100 mL; se les agregaron 4 mL de una solución KCl al 1.5 %, 1 mL de Heparina (concentración de 1000 U.I./mL) y 70 mL de agua desionizada. Después de 3 min, la mezcla se centrifugó a 3000 rpm por 5

Se desechó el sobrenadante y al sedimento se le agregaron 30 mL de KCl al 1.15 %, se agitó y volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Al sedimento se le agregaron 20 mL de una solución amortiguadora Tris HCl 30 mM de pH 8 y se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min a 10 °C. El sedimento final fue resuspendido en solución amortiguadora Tris HCl 30 mM de pH 8.

2.2.- Medición de las metalotioneínas

Se mezclaron 400 µL del homogeneizado de las planarias con 400 µL de una solución amortiguadora de Glicina 0.5 M, pH 8.5 y 250 µL del estándar de Plata de 1000 ppm. Se agitó la mezcla suavemente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se les adicionaron 400 µL del hemolizado, y se calentó la mezcla a 75 °C en un baño María por 5 min. La mezcla se centrifugó a 10 000 rpm, 5 min a 25 °C, separándose el sobrenadante y se repitió el proceso tres veces más. El sobrenadante final se conservó en HNO₃ al 3 % en proporción 1:10 (v/v sobrenadante/ácido).

El contenido de la plata se determinó por absorción atómica a 328.1 nm en el instrumento SpectrAA 100/200 manejándose las siguientes condiciones de prueba: tiempo de medición de la muestra, 3 seg; tipo de flama, aire/acetileno; flujo de aire, 13.5 L/min; flujo del acetileno, 2 L/min. Las lecturas de las muestras se compararon contra una curva patrón de concentraciones de 1, 2, 3, 4 ppm de Plata.

2.3.- Hemocianina

Esta prueba se realizó por el método de digestión ácida, para esto se colocaron 1.0 mL del homogeneizado de planaria y 10 mL de HNO₃ concentrado en un tubo Nalgene de capacidad máxima de 30 mL. La mezcla se calentó en una autoclave a 121 °C y 1.5 lb de presión por 30 min. Posteriormente, las mezclas frías se diluyen 1 a 10 con HNO₃ al 3 % y se leyó a 324.8 nm en el espectro de absorción atómica SpectrAA 100/200 manejándose las siguientes condiciones de prueba: tiempo de medición de la muestra, 3 seg; tipo de flama, aire/acetileno; flujo de aire, 13.5 L/min; flujo del acetileno, 2 L/min. Las lecturas de las muestras se compararon contra una curva patrón de concentraciones de 2, 4, 6, 8, 10 ppm de cobre (Martínez - Tabche, 1999).

3.4.5.- Cuantificación del zinc

Para la cuantificación de este metal, se mezclaron en tubos Nalgene de 30 mL, 1 g del sedimento o 1 mL de agua o 1 mL del homogeneizado, con 5 mL de HNO₃ concentrado y algunas perlas de ebullición. Las mezclas se calentaron en un autoclave a 121 °C y 15 Lb de presión por 30 min. Una vez enfriadas las muestras, se cuantificó la concentración del metal a 213.9 nm en el espectro de absorción atómica SpectraAA 100/200, manejándose las siguientes condiciones de prueba: tiempo de medición de la muestra, 3 seg; tipo de flama, aire/acetileno; flujo del aire, 13.5 L/min; flujo del acetileno, 2.12 L/min. Las lecturas de las muestras se comparan contra una curva patrón con concentraciones de 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 y 1.25 ppm del tóxico (APHA, 1995).

3.6.- Cálculo del factor de bioconcentración y análisis estadístico

Este factor es el resultado de la proporción del metal que se encuentra en el organismo con respecto al encontrado en el sedimento, y se calcula de la siguiente manera :

$$FB = \frac{\% \text{ recuperación en la planaria}}{\% \text{ recuperación en el sedimento}}$$

$$\% \text{ recuperación en la planaria} = \frac{\text{Zn encontrado en el tejido húmedo} \times 100}{\text{concentración inicial de Zn probada}}$$

$$\% \text{ recuperación en el sedimento} = \frac{\text{Zn encontrado en el sedimento húmedo} \times 100}{\text{concentración inicial de Zn probada}}$$

$$\% \text{ recuperación en el agua} = \frac{\text{Zn encontrado en el agua} \times 100}{\text{concentración inicial de Zn probada}}$$

Los análisis estadísticos que se realizaron fueron las pruebas de análisis de Varianza y una comparación de las medias de Duncan (Miller, 1992). Los respectivos resultados se muestran en los resultados.

RESULTADOS

Características del sedimento.

Como se puede apreciar en la Tabla 6 se llegó a obtener un valor de 1.03 % de materia orgánica lo que corresponde a un suelo medianamente enriquecido. La humedad con un valor del 1.8-2.0 % refleja un suelo rico en agua. El pH medido fue cercano a ser neutro. El valor obtenido del nitrógeno total (0.35 %) muestra que el sedimento de la presa Ignacio Ramírez es pobre en este elemento. En el caso del análisis granulométrico, la Tabla 7, muestra que el 96.12 % del sedimento se concentra en las mallas no.30, 50 y 80, siendo esta una señal de homogeneidad de la muestra ya que prácticamente tres cuartos del sedimento presentaron el mismo tamaño de partícula.

.- Propiedades fisicoquímicas

Tabla 6.- Resultados de las pruebas al sedimento de PIR

Prueba	Resultado
Porcentaje de materia orgánica	1.03 %
Porcentaje de humedad	1.8 – 2.0 %
Determinación del pH	7.04
Porcentaje del nitrógeno total	0.35 %
Análisis granulométrico	Ver tabla 7

Tabla 7.- Análisis granulométrico del sedimento

No. Malla	Porcentaje de muestra retenida
10	0.99 %
30	11.02 %
50	73.58 %
80	11.52 %
100	0.50 %
140	0.60 %
200	0.60 %
Base	1.2 %

2.- Toxicidad aguda del zinc

En cuanto al efecto tóxico de los animales se llegó a notar una disminución en sus movimientos como primera respuesta al tóxico, se llegó hasta una inmovilización total y después lentamente se fueron fraccionando en pedazos y desprendieron una mucosidad blanca para finalmente deshacerse o completo al perder piel, en la Tabla 8 se muestran los resultados de esta prueba.

2.1.- Los resultados de la toxicidad del zinc a las 96 h en el agua.

Tabla 8.- Resultados de la toxicidad aguda en agua a las 96 horas*

Dosis del Zinc (ppm)	No. de organismos por prueba	No. de organismos acumulados a las 96 h.	No. de organismos muertos acumulados	Log ₁₀ de la dosis	% mortalidad	Unidades probit
6.25	15	90	31	0.79588	34.44	4.59810
12.5	15	90	38	1.09691	42.22	4.80283
25.0	15	90	52	1.39794	57.78	5.19717
50.0	15	90	77	1.69897	85.56	6.06489
100.0	15	90	90	2.00000	100.00	8.40000

*Datos obtenidos del programa *Montpellier, Fevrier 1987.*

A partir de estos resultados se calculó la ecuación de la recta ($Y = 1.89802x + 2.83842$), esta prueba muestra un comportamiento de los organismos lineal. Con esta ecuación se determinó los parámetros indicados en la Tabla 9.

Tabla 9.- Parámetros indicadores de toxicidad aguda*

Parámetro	Valor	Limite inferior	Limite superior
CL ₅₀	13.77 ppm	7.44 ppm	25.49 ppm
CL ₂₀	4.96 ppm	1.71 ppm	14.36 ppm
CL ₉₀	65.17 ppm	24.67 ppm	172.21 ppm

*Con un límite de confianza del 95 %

Como se puede apreciar en esta última tabla efectivamente el valor de la CL₅₀ se situó en un lugar medio de las concentraciones probadas, esto indica que los tratamientos propuestos siguen una cierta lógica.

1.- Los resultados a las 96 horas en los sistemas de agua - sedimento.

Aunque en el sistema natural siempre estarán presentes ambos elementos (agua y sedimento), es importante realizar este tipo de pruebas primero solo con agua para tener como referencia el comportamiento del tóxico con un solo elemento. Posteriormente al probarlo con un elemento adicional como el sedimento, generalmente se llega a observar un aumento del efecto tóxico, debido a su interacción con el tamaño de grano, los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10.- Resultados de la toxicidad aguda en sedimento a las 96 horas*

Dosis (ppm)	No. de organismos por prueba	No. de organismos acumulados a las 96 h.	No. de organismos muertos acumulados	Log ₁₀ de la dosis	% mortalidad	Unidades probit
10.0	10	60	6	1.00000	10.00	3.17315
11.22	10	60	17	1.04999	28.33	4.42484
12.58	10	60	38	1.09968	63.33	5.34204
14.12	10	60	42	1.14983	70.00	5.52640
15.84	10	60	50	1.19976	83.33	5.97133

*Datos obtenidos del programa *Montpellier, Fevrier 1987.*

Se calculó la ecuación de la recta ($Y = 11.07722x - 7.15959$) y así, a partir de esta ecuación, se determinaron los parámetros indicados en la Tabla 11. En este sistema el porcentaje de mortalidad es pequeño en la primera concentración probada (10 ppm) ya que solamente es del 10 %, en el caso de la concentración de 11.22 ppm de Zn, se incrementa en un 18.33 % con respecto a la anterior, en la tercera concentración (12.58 ppm Zn) creció en un 35 % con respecto a la anterior inmediata y la cuarta concentración (14.12 ppm Zn) creció en un 6.67 % con respecto a la anterior inmediata, así en la última concentración (15.84 ppm) vuelve a dar un brinco del 13.33 % con respecto a su anterior inmediata. En este sistema los organismos llegaron a presentar el mismo efecto tóxico que en el caso de la toxicidad aguda en agua.

Tabla 11.- Parámetros indicadores de toxicidad aguda*

Parámetro	Valor	Límite inferior	Límite superior
CL ₅₀	12.52 ppm	11.87 ppm	13.21 ppm
CL ₂₀	10.51 ppm	9.68 ppm	11.42 ppm
CL ₉₀	16.34 ppm	14.68 ppm	18.20 ppm

*Con un límite de confianza del 95 %

4.3.- Toxicidad subletal del zinc.

4.3.1.- Proteínas.

Aunque aquí se llegan a cuantificar todo tipo de proteínas en general se observa un incremento debido a las metalotioneínas, proteínas que son sensibles a los metales y en presencia de estos últimos su producción aumenta.

Así podemos ver en el control (Tabla 12) una concentración de 0.01298 mg/g tejido húmedo, en la primera concentración probada (0.1296 ppm Zn) llego a incrementarse en un 3000 % con respecto al testigo. En la segunda concentración probada (0.2592 ppm Zn) llego a aumentar al doble con respecto a la inmediata anterior al incrementarse prácticamente el doble la cantidad de Zn presente en el organismo. En la concentración de 0.5173 ppm de Zn sucedio algo semejante a la concentración anterior. Al tener 1.5356 ppm de Zn se triplico la cantidad del tóxico y la cantidad de proteínas encontradas se triplico de igual manera. En la concentración de 3.0641 ppm de Zn se incremento practicamente el doble de la cantidad del tóxico con respecto a la cantidad inferior inmediata y las proteínas aumentaron al doble con respecto a la anterior inmediata aunque la concentración encontrada de Zn en el organismo no se duplico sino que aumento mucho mas, prácticamente se triplico. De hecho en la regresión lineal, el coeficiente de correlación al cuadrado es de 0.9723, de esta manera el último resultado es concordante ya que la linealidad se empieza a perder. En la última concentración de 985 ng/g tejido húmedo se llega a encontrar un incremento de cerca del 200 % con respecto a la anterior, mientras las proteínas llegan a aumentar un 100 % aproximadamente.

Tabla 12.- Contenido de proteínas en los tejidos de las planarias en función de las concentraciones de zinc encontradas en la planaria*.

Concentración del Zn Probada en ppm	Concentración de Zn encontrado en la Planaria en ng/g tejido húmedo	Mg proteínas/g tejido húmedo ± DE
0	0.9 (Testigo)	0.01298 ± 0.00025
0.1296	7	0.39955 ± 0.00021
0.2592	16	0.68058 ± 0.00025
0.5173	39	1.13752 ± 0.00023
1.5356	157	3.98355 ± 0.00021
3.0641	540	6.98048 ± 0.00019
4.4289	985	8.06748 ± 0.00025

*Los resultados son el promedio de 6 réplicas con un limite de confianza del 95 %.

En la Figura 5 se puede llegar a apreciar un comportamiento diferente de las primeras concentraciones de zinc probadas con respecto a las últimas ya que la variación de la concentración de las proteínas es mayor en las tres últimas muestras con respecto a las primeras.

Los resultados de cada replica se aprecian en la Tabla 13, mientras el análisis estadístico es presentado en las Tablas 14 – 18. Podemos ver que tanto en el análisis de varianza como en la prueba de Duncan, donde se comparan las medias, nos indican diferencias significativas con respecto al testigo y entre algunos grupos.

Tabla 13.- Resultados de las seis replicas de cada concentración de zinc de proteínas en mg/g tejido húmedo.

Replica	Testigo	0.1296	0.2592	0.5173	1.5356	3.0641	4.4289
		ppm-Zn	ppm-Zn	ppm-Zn	ppm-Zn	ppm-Zn	ppm-Zn
1	0.0129	0.3995	0.6806	1.1373	3.9835	6.9802	8.0673
2	0.0130	0.3997	0.6803	1.1375	3.9838	6.9806	8.0675
3	0.0134	0.3992	0.6805	1.1377	3.9832	6.9803	8.0674
4	0.0128	0.3996	0.6807	1.1372	3.9837	6.9807	8.0672
5	0.0131	0.3998	0.6804	1.1378	3.9835	6.9805	8.0676
6	0.0127	0.3995	0.6810	1.1376	3.9836	6.9806	8.0679

Tabla 14.- Estadística descriptiva de la prueba de proteínas.

Replica	N	Mínimo	Máximo	Media	DE	Varianza
TESTIGO	6	0.0127	0.0134	1.29833E-02	2.48328E-04	6.167E-08
1	6	0.3992	0.3998	0.399550	2.07364E-04	4.300E-08
2	6	0.6803	0.6810	0.680583	2.48328E-04	6.167E-08
3	6	1.1372	1.1378	1.137517	2.31661E-04	5.367E-08
4	6	3.9832	3.9838	3.983550	2.07364E-04	4.300E-08
5	6	6.9802	6.9807	6.980483	1.94079E-04	3.767E-08
6	6	8.0672	8.0679	8.067483	2.48328E-04	6.167E-08

Tabla 15.- Análisis de Varianza de la prueba de proteínas.

	Suma de cuadrados	Gl	Media de los cuadrados	F*
Entre grupos	402.0860	6	67.014	1294665157.779
Dentro de grupos	1.812E-03	35	5.176E-08	
Total	402.0878	41		

F* sacada de tablas 2.46

Tabla 16.- Análisis de Duncan de la prueba de proteínas.

Suma de los cuadrados del error	Medida de los cuadrados del error	DE de las medias
0.0018	5.1428-05	0.00293

Tabla 17.- Valores de r_p multiplicado por la DE de las medias en la prueba de proteínas.

P	2	3	4	5	6	7
r_p	0.0084	0.0088	0.0091	0.0093	0.0095	0.0096

Tabla 18.- Resultados de las comparaciones entre las medias en la prueba de proteínas.

Medida de cada tratamiento	0.0129	0.3995	0.6805	1.1375	3.9835	6.9804	8.0674
0.0129							
0.3995	0.3866						
0.6805	0.6676	0.281					
1.1375	1.1246	0.738	0.457				
3.9835	3.9706	3.584	3.303	2.8460			
6.9804	6.9675	6.5809	6.2999	5.8429	2.9969		
8.0674	8.0545	7.6679	7.3869	6.9299	4.0839	1.087	

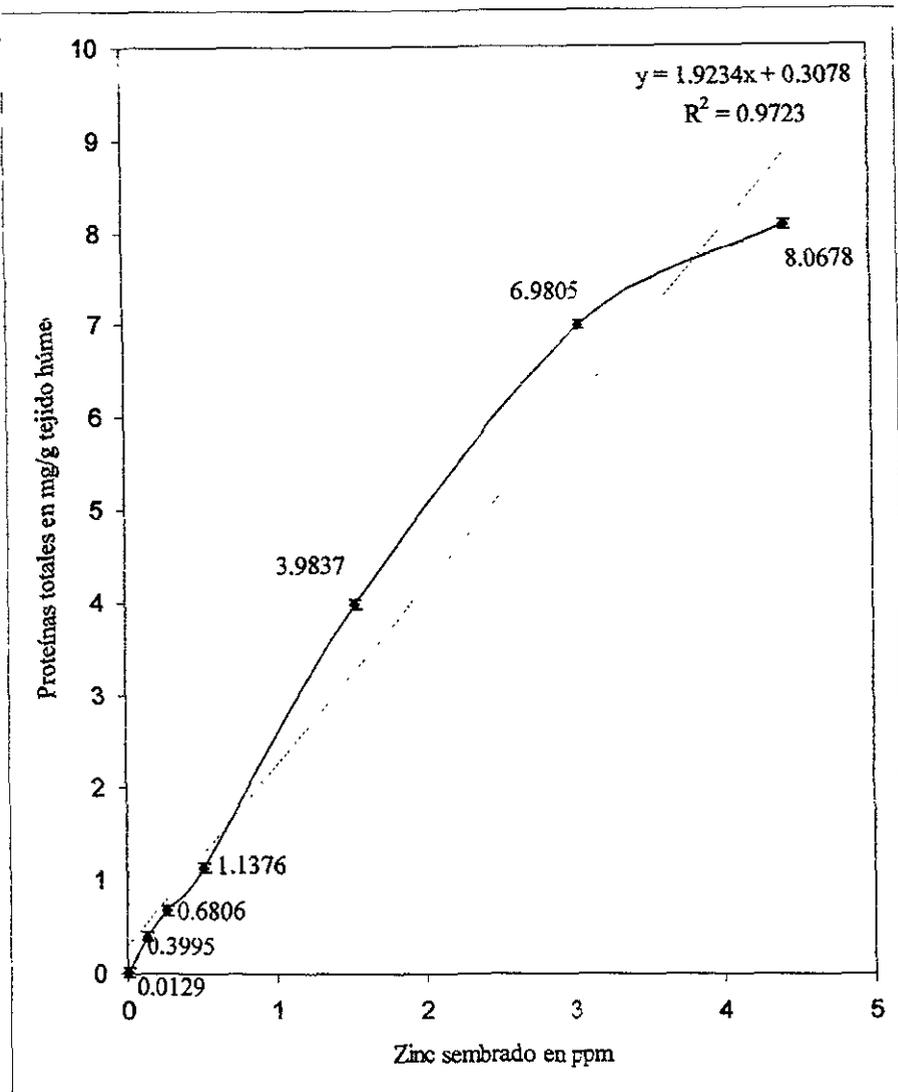


Figura 5.- Concentración de proteínas en los tejidos de las planarias a las 96 h en el sistema de flujo continuo, su relación lineal y la desviación estándar.

4.3.2.- Cambios en las metalotioneínas

Aquí se ve una respuesta similar a la observada con las proteínas (4.3.1). En la concentración de 0.2592 ppm al aumentar el doble con respecto a la anterior inmediata, llega a reflejar un aumento de la misma magnitud en la concentración de zinc encontrado en los organismos pero no en las metalotioneínas donde el aumento es solo de un 20 %. En la concentración de 0.5173 ppm de Zn, llega a suceder algo muy parecido que en el caso anterior. Al probar la concentración de 1.5356 ppm de Zn se encontró un triple aumento tanto en la concentración de Zn en el organismo como en las metalotioneínas con respecto a la cantidad inmediata anterior. En el caso de la cantidad de 3.0641 ppm de Zn al aumentar el doble del tóxico probado no se llega a obtener una doble cantidad de metalotioneínas, sino que solo aumentó en un 43 %. Finalmente, en la concentración de 4.4289 ppm de Zn llega a presentarse una correspondencia ya que al aumentar el tóxico en un 44 % las metalotioneínas aumentan en un 40 % con respecto a la concentración inmediata anterior probada. Otra gran diferencia con la prueba de las proteínas es la linealidad que llegó a presentar ya que su coeficiente de correlación al cuadrado fue de 0.9931 (Figura 6).

Los resultados de esta prueba se pueden observar en las Tabla 19 y 20.

Tabla 19.- Cambios en el contenido de las metalotioneínas de la planaria en función de la concentración de zinc*.

Concentración del Zn Probada en ppm	Concentración de Zn encontrado en la planaria en ng/g tejido húmedo	µg metalotioneínas/g tejido húmedo ± DE
0	0.9 (Testigo)	1.20668 ± 0.00015
0.1296	7	1.64015 ± 0.00027
0.2592	16	1.98010 ± 0.00026
0.5173	39	2.33318 ± 0.00023
1.5356	157	5.13015 ± 0.00018
3.0641	540	7.34515 ± 0.00021
4.4289	985	10.45318 ± 0.00023

*Los resultados son el promedio de 6 réplicas con un límite de confianza del 95 %.

Tabla 20.- Resultados de metalotioneínas en $\mu\text{g/g}$ tejido húmedo de cada replica.

Replica	Testigo	0.1296	0.2592	0.5173	1.5356	3.0611	4.4289
		ppm Zn					
1	1.2066	1.6402	1.9803	2.3332	5.1302	7.3452	10.4532
2	1.2068	1.6405	1.9801	1.3335	5.1300	7.3450	10.4535
3	1.2065	1.6401	1.9805	1.3331	5.1299	7.3449	10.4531
4	1.2069	1.6398	1.9798	1.3329	5.1304	7.3452	10.4530
5	1.2066	1.6404	1.9800	1.3330	5.1301	7.3451	10.4529
6	1.2067	1.6399	1.9799	1.3334	5.1303	7.3455	10.4534

Con respecto a su análisis estadístico podemos apreciar que tanto el análisis de Varianza o la prueba de Duncan nos muestran diferencias significativas con respecto al testigo y entre los grupos. (Tablas 21 – 25).

En cuanto a la figura 6 se puede apreciar que sigue un comportamiento parecido al de las proteínas pero en la metalotioneínas se podría suponer que su producción continúa mientras que en las proteínas parece presentar una meseta al final de las concentraciones probadas.

Tabla 21.- Estadística descriptiva de la prueba de las metalotioneínas.

Muestra	N	Mínimo	Máximo	Media	DE	Varianza
Testigo	6	1.2065	1.2069	1.206683	1.47196E-04	2.167E-08
1	6	1.6398	1.6405	1.640150	2.73861E-04	7.500E-08
2	6	1.9798	1.9805	1.980100	2.60768E-04	6.800E-08
3	6	2.3329	2.3335	2.333183	2.31661E-04	5.367E-08
4	6	5.1299	5.1304	5.130150	1.87083E-04	3.500E-08
5	6	7.3449	7.3455	7.345150	2.07364E-04	4.300E-08
6	6	10.4529	10.4535	10.453183	2.31661E-04	5.367E-08

Tabla 22.- Análisis de Varianza de la prueba de metalotioneínas.

	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado de las medias	F
Entre grupos	465.528	6	77.588	3258.559
Dentro de grupos	0.833	35	2.381E-02	
Total	466.361	41		

*F sacada de tablas 2.46

Tabla 23.- Análisis de Duncan de la prueba de metalotioneínas.

Suma de los cuadrados del error	Media de los cuadrados del error	DE de las medias
0.833	0.0238	0.0630

Tabla 24.- Valores de r_p multiplicado por la DE de las medias

1	2	3	4	5	6	7
R_p	0.1811	0.1903	0.1962	0.2006	0.2038	0.2066

Tabla 25.- Resultados de las comparaciones entre las medias de la prueba de Duncan de las metalotioneínas.

Medio de cada tratamiento	1.2067	1.6401	1.9801	2.3332	5.1301	7.3451	10.4532
1.2067							
1.6401	0.4334						
1.9801	0.7734	0.34					
2.3332	1.1265	0.6931	0.3531				
5.1301	3.9234	3.49	3.15	2.7969			
7.3451	6.1384	5.705	5.365	5.0119	2.215		
10.4532	9.2465	8.8131	8.4731	8.12	5.3231	3.1081	

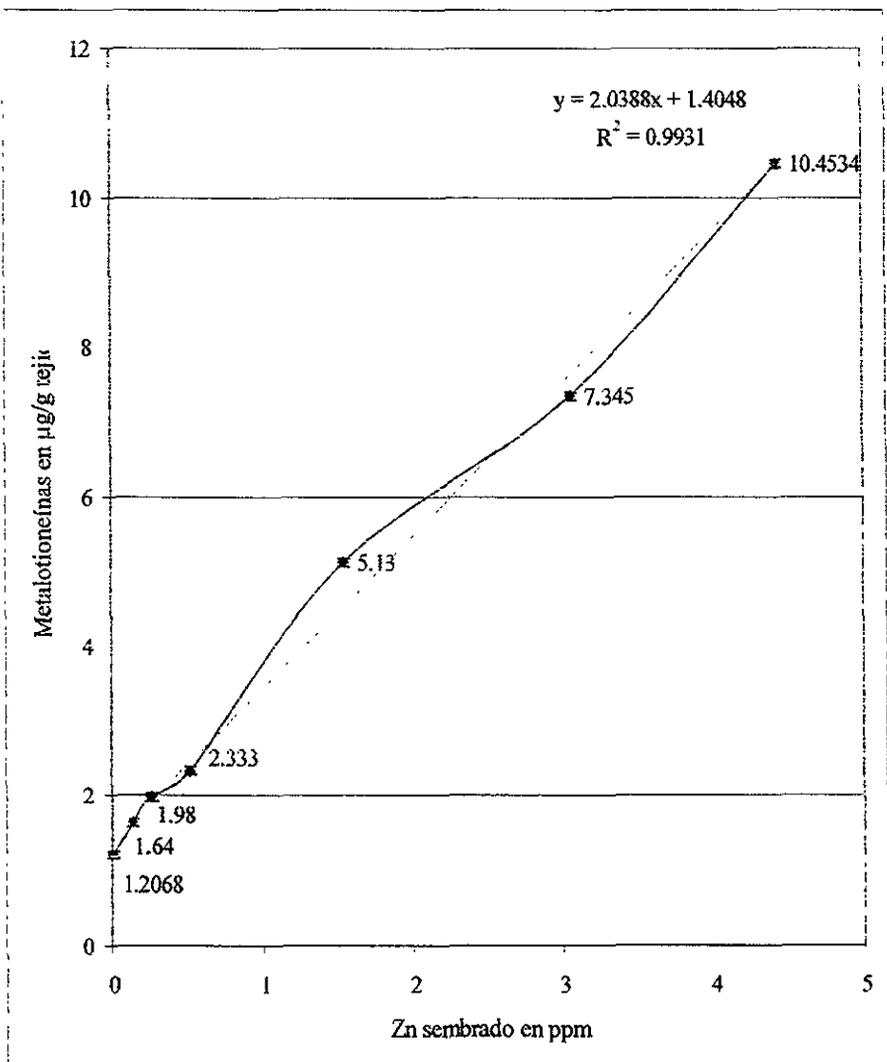


Figura 6.- Concentración de metalotioneínas en los tejidos de las planarias después de 96 h en el sistema de flujo continuo, su linealidad y su desviación estándar.

4.3.3.- Cambios en la concentración de hemocianina en la planaria.

En la primera concentración probada (0.1296 ppm Zn) podemos observar que la disminución es realmente despreciable por ser solo del 2 % con respecto al testigo (Tabla 26). En la siguiente concentración probada (0.2592 ppm Zn) el decremento de la hemocianina es del 15 % con respecto a la concentración inferior inmediata. Este porcentaje llegó a aumentar al 17 % en la concentración de 0.5273 ppm de Zn probada. Donde se ve una disminución muy notoria es en la siguiente concentración (1.5356 ppm de Zn), observándose un 60 % menos de hemocianina con respecto a la concentración inferior inmediata. En la concentración de 3.0641 ppm de Zn la hemocianina llegó a disminuir en un 30 % que si bien no es un valor tan grande como en el caso anterior si es considerable. Finalmente la concentración de 4.4289 ppm de zinc presentó una disminución del 28 % con respecto al valor inferior inmediato siendo de igual manera que el anterior un valor que no se debe de despreciar. Con respecto a su linealidad es muy irregular ya que su coeficiente de correlación al acuarro fue de 0.8441 como se puede observar en la Figura 7.

Tabla 26.- Cambios en la concentración de hemocianina en el tejido de las planarias en función del zinc*.

Concentración del Zn Probada en ppm	Concentración de Zn encontrado en la planaria en n ^o /g tejido húmedo	µg hemocianina/g tejido húmedo ± DE
0	0.9 (Testigo)	6.27125 ± 0.00019
0.1296	7	6.14775 ± 0.00019
0.2592	16	5.23555 ± 0.00019
0.5173	39	4.38708 ± 0.00031
1.5356	157	1.78233 ± 0.00022
3.0641	540	1.26513 ± 0.00022
4.4289	985	0.91485 ± 0.00024

*Los resultados son el promedio de 6 réplicas con un límite de confianza del 95 %.

Los resultados de cada réplica se puede observar en la Tabla 27, mientras que el análisis estadístico, presentado en las Tablas 28 - 32 también lleva a pensar en una diferencia significativa entre algunos tratamientos y con respecto al testigo. Estas diferencias se llegaron a

presentar tanto en los resultados obtenidos para el análisis de varianza como en los obtenidos en la prueba de Duncan.

Tabla 27.- Resultados de la hemocianina en $\mu\text{g/g}$ tejido húmedo de cada replica.

Replica	Testigo	0.1296	0.2592	0.5173	1.5356	3.0641	4.4289
		ppm Zn					
1	6.2713	6.1478	5.2356	4.3870	1.7820	1.2653	0.9145
2	6.2711	6.1480	5.2355	4.3867	1.7824	1.2650	0.9148
3	6.2715	6.1475	5.2353	4.3872	1.7822	1.2648	0.9150
4	6.2710	6.1477	5.2357	4.3876	1.7825	1.2652	0.9147
5	6.2712	6.1479	5.2354	4.3871	1.7823	1.2651	0.9149
6	6.2714	6.1476	5.2358	4.3869	1.7826	1.2654	0.9152

Con respecto a la figura 7 se puede apreciar un comportamiento en donde la disminución en concentración de hemocianina es crítica en la concentración de 1.5356 ppm de Zn probado.

Tabla 28.- Estadística descriptiva de la prueba de la hemocianina.

Muestra	N	Mínimo	Máximo	Media	DE	Varianza
TESTIGO	6	6.2710	6.2715	6.271250	1.87083E-04	3.500E-08
1	6	6.1475	6.1480	6.147750	1.87083E-04	3.500E-08
2	6	5.2353	5.2358	5.235550	1.87083E-04	3.500E-08
3	6	4.3867	4.3876	4.387083	3.06050E-04	9.367E-08
4	6	1.7820	1.7826	1.782333	2.16025E-04	4.667E-08
5	6	1.2648	1.2654	1.265133	2.16025E-04	4.667E-08
6	6	0.9145	0.9152	0.914850	2.42899E-04	5.900E-08

Tabla 29.- Análisis de Varianza de la prueba de la hemocianina.

	Suma de cuadrados	Gl	Media de los cuadrados	F*
Entre grupos	196.766	6	32.794	654018215.095
Dentro de grupos	1.755E-03	35	5.014E-08	
Total	196.7642	41		

*F sacada de tablas 2.46

Tabla 30.- Análisis de Duncan de la prueba de la hemocianina.

Suma de los cuadrados del error	Media de los cuadrados del error	DE de las medias
0.0018	5.1428E-05	0.0029

Tabla 31.- Valores de r_p multiplicado por la DE de las medias

P	2	3	4	5	6	7
R_p	0.0083	0.0088	0.0090	0.0092	0.0094	0.0095

Tabla 32.- Resultados de las comparaciones entre las medias de la prueba de Duncan de la hemocianina.

Media de cada tratamiento	6.2713	6.1478	5.2355	4.3878	1.7823	1.2651	0.9148
6.2713							
6.1478	0.1235						
5.2355	1.0358	0.9123					
4.3878	1.8835	1.76	0.8477				
1.7823	4.489	4.3655	3.4532	2.6055			
1.2651	5.0062	4.8827	3.9704	3.1227	0.5172		
0.9148	5.3565	5.233	4.3207	3.473	0.8675	0.3503	

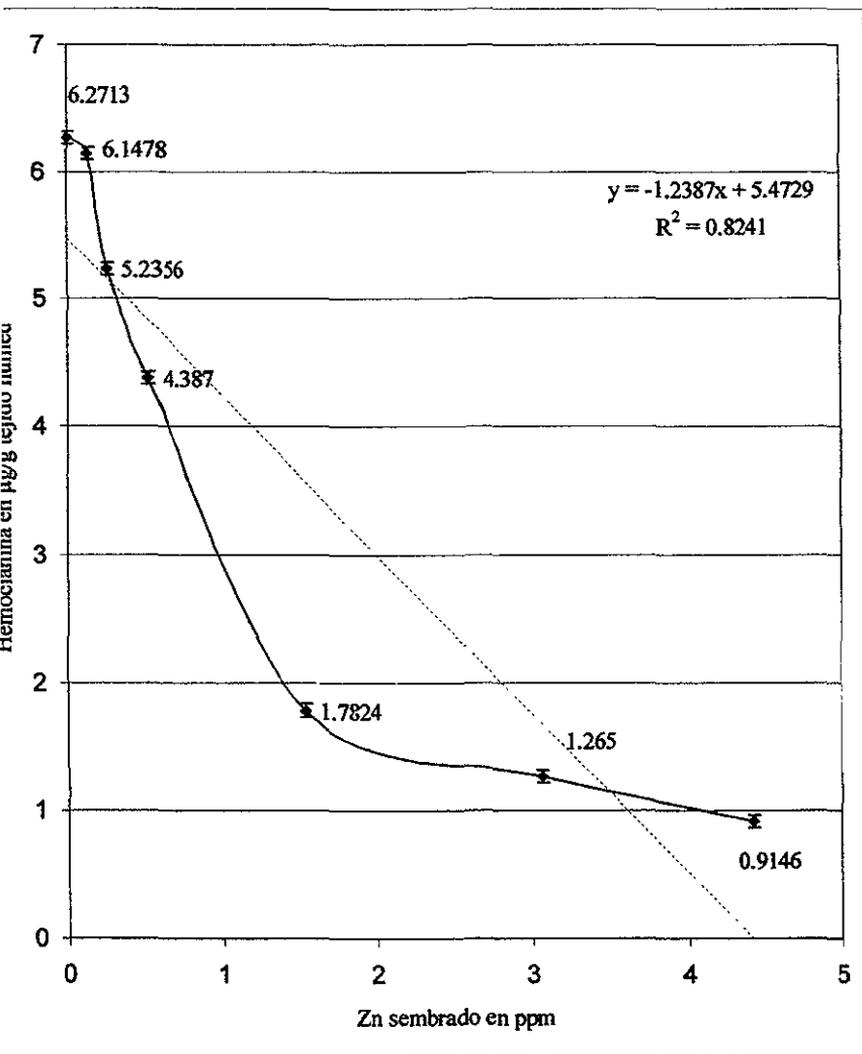


Figura 7.- Concentración de hemocianina en los tejidos de la planaria después de 96 h en el sistema de flujo continuo, su linealidad y su desviación estándar.

.- Contenido del zinc.

1.- En el sedimento

Los resultados muestran que en la primera concentración del tóxico encontrada en el fimiento (0.11542 $\mu\text{g/g}$ sedimento) el porcentaje de recuperación con respecto al testigo en lidad no es muy diferente ya que solo cambia en un 8 % (Tabla 33). Es más bien en la segunda ncentracion (0.16045 $\mu\text{g/g}$ sedimento) donde el porcentaje de recuperación si llega a disminuir en considerable 28 % con respecto a la concentración anterior inmediata. En la concentración de 23440 $\mu\text{g/g}$ sedimento nuevamente el porcentaje llega a disminuir notablemente en un 16 % con respecto al porcentaje anterior. En la siguiente concentración probada (1.5356 ppm de Zn) la sminución es de menor, del 9 % con respecto a la anterior inmediata. Prácticamente en las dos ncentraciones finales (1.08348 y 1.43768 $\mu\text{g/g}$ sedimento) la diferencia con respecto a la ncentración inmediata anterior llega a ser despreciable ya que solo es del 1 % para el primer caso 3 % para el segundo, esto llama la atención ya que la cantidad de tóxico incorporado al sistema si gga a ser grande. En la tabla 34 se muestran los valores obtenidos. En cuanto a la linealidad, se uede apreciar una relación casi de 1 a 1 de la concentración probada con respecto a la encontrada a que su coeficiente de correlación al cuadrado es de 0.9965 (Figura 8).

Tabla 33.- Cambios en el contenido de Zn en el sedimento del sistema después de 96 h*.

Concentración de Zn en ppm sembrados en el sistema	Zn encontrado $\mu\text{g/g}$ sedimento \pm DE	% Recuperación
0 (Testigo)	0.01205 \pm 0.00019	97.3478
0.1296	0.11542 \pm 0.00017	89.0432
0.2592	0.16045 \pm 0.00019	61.8827
0.5173	0.23440 \pm 0.00026	45.3315
1.5356	0.55365 \pm 0.00019	36.0575
3.0641	1.08348 \pm 0.00023	35.3578
4.4289	1.43768 \pm 0.00015	32.4595

* El resultado es el promedio de seis replicas con un limite de confianza del 95 %.

Tabla 34.- Resultados de cada replica en μg de Zn/g sedimento.

Replica	Testigo	0.1296	0.2592	0.5173	1.5356	3.0641	4.4289
		ppm Zn					
1	0.0120	0.1154	0.1604	0.2345	0.5537	1.0832	1.4376
2	0.0123	0.1152	0.1602	0.2343	0.5535	1.0834	1.4379
3	0.0119	0.1157	0.1606	0.2347	0.5538	1.0838	1.4375
4	0.0121	0.1154	0.1605	0.2346	0.5536	1.0835	1.4377
5	0.0118	0.1155	0.1603	0.2344	0.5534	1.0837	1.4376
6	0.0122	0.1153	0.1607	0.2348	0.5539	1.0833	1.4378

En los resultados estadísticos tanto el de análisis de varianza como en la prueba de Duncan muestran que en cada caso con respecto al testigo y entre algunos tratamientos si llegan a presentar diferencias significativas (Tablas 35 – 39).

Tabla 35.- Estadística descriptiva del contenido de zinc encontrado en el sedimento a las 96 h.

Muestra	N	Mínimo	Máximo	Media	DE	Varianza
TESTIGO	6	0.0118	0.0123	1.20500E-02	1.87083E-04	3.500E-08
1	6	0.1152	0.1157	0.115417	1.72240E-04	2.967E-08
2	6	0.1602	0.1607	0.160450	1.87083E-04	3.500E-08
3	6	0.2340	0.2347	0.234400	2.60768E-04	6.800E-08
4	6	0.5534	0.5539	0.553650	1.87083E-04	3.500E-08
5	6	1.0832	1.0838	1.083483	2.31661E-04	5.367E-08
6	6	1.4375	1.4379	1.437683	1.47196E-04	2.167E-08

Tabla 36.- Análisis de Varianza del contenido de zinc en el sedimento.

	Suma de cuadrados	Gl	Media de los cuadrados	F*
Entre grupos	10.758	6	1.793	51228188.499
Dentro de grupos	1.225E-03	35	3.500E-08	
Total	10.7592	41		

*F sacada de tablas 2.46

Tabla 37.- Análisis de Duncan del contenido de zinc en el sedimento.

Suma de los cuadrados del error	Media de los cuadrados del error	DE de las medias
0.0012	3.428E-05	0.0024

Tabla 38.- Valores de r_p multiplicado por la DE de las medias.

P	2	3	4	5	6	7
R_p	0.0069	0.0072	0.0075	0.0076	0.0078	0.0079

Tabla 39.- Resultados de las comparaciones entre las medias en la prueba de Duncan.

Media de cada tratamiento	0.0120	0.1154	0.1604	0.2344	0.5536	1.0834	1.4376
0.0120							
0.1154	0.1034						
0.1604	0.1484	0.045					
0.2344	0.2224	0.119	0.074				
0.5536	0.5416	0.4382	0.3932	0.3192			
1.0834	1.0714	0.968	0.923	0.849	0.5298		
1.4376	1.4256	1.3222	1.2772	1.2032	0.884	0.3542	

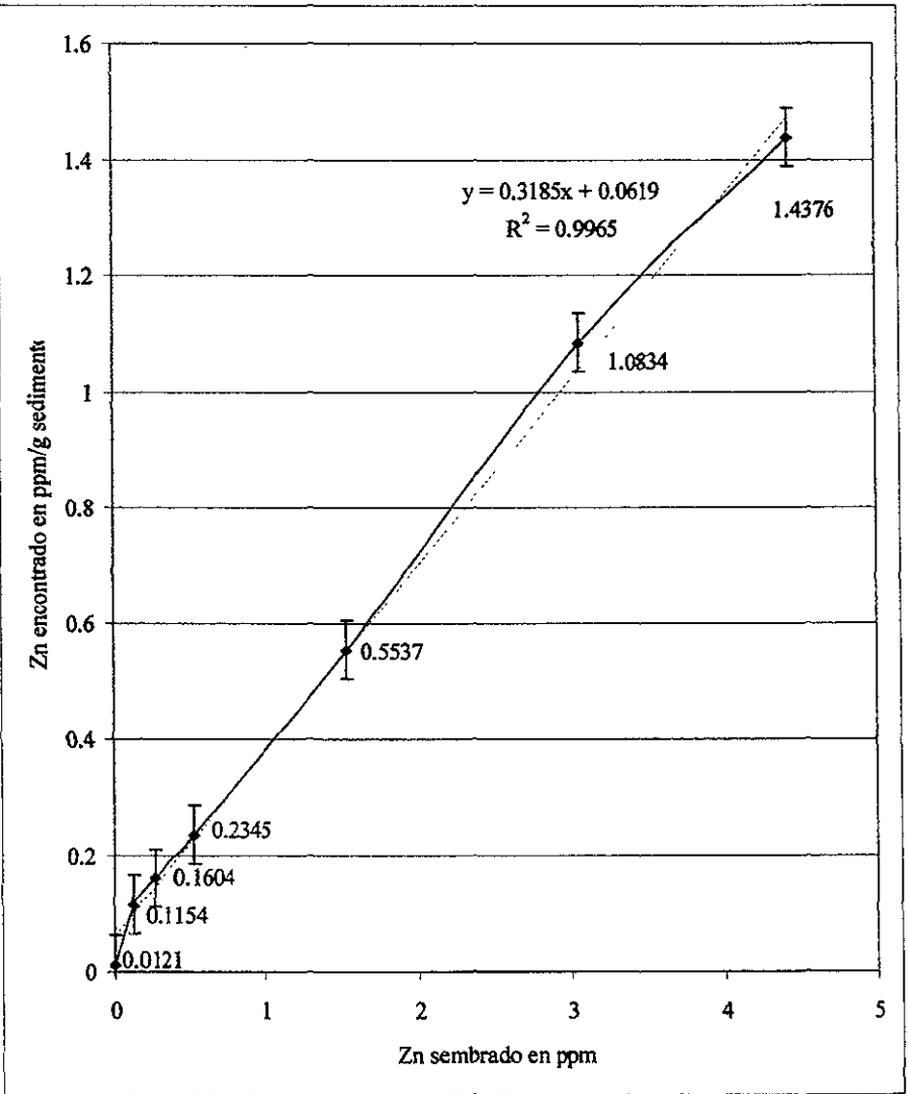


Figura 8.- Relación del zinc sembrado contra el recuperado en el sedimento después de 96 h en el sistema de flujo continuo, su linealidad y su desviación estándar.

4.2.- En el agua

Se puede ver que en la primera concentración encontrada del metal en el agua del sistema (0.00192 µg/mL. de agua) llega a diferir en un 1 % con respecto al testigo (Tabla 40), ahora bien en la segunda concentración probada (0.2592 ppm), el porcentaje de recuperación con respecto a la concentración inferior inmediata llega a ser una diferencia muy grande por ser del 24 %, siendo esta parte crítica ya que en las siguientes concentraciones la diferencia no es tan grande, por ejemplo en la concentración probada de 0.5173 ppm de Zn el porcentaje de recuperación aumento en un 6 %. En la concentración siguiente de 1.5356 ppm de Zn a pesar de que se incorpora una gran cantidad del tóxico al sistema solo llega a aumentar el porcentaje de recuperación en un 3 % con respecto al anterior inmediato. Pasa algo semejante en la concentración siguiente de de 3.0641 ppm de Zn. Finalmente en la última concentración de 4.4289 ppm de Zn prácticamente el porcentaje de recuperación no cambia con la cantidad inferior inmediata. Los resultados se pueden observar en las Tablas 40 y 41. Los resultados de cada tratamiento se pueden consultar en la tabla 41. Con respecto a la relación lineal al igual que en el sedimento, la relación de la cantidad sembrada en el sedimento con la cantidad encontrada en el agua es casi de 1 a 1 ya que su coeficiente de correlación al cuadrado es de 0.9991 (Figura 9).

Tabla 40.- Cuantificación del Zn en agua del sistema a las 96 horas*

Concentración de Zn en ppm sembrados en el sistema	Zn encontrado µg/mL. de agua ± DE	% Recuperación
0 (Testigo)	0.00072 ± 0.00015	0.1800
0.1296	0.00192 ± 0.00021	1.4660
0.2592	0.00651 ± 0.00019	25.1443
0.5173	0.16892 ± 0.00023	32.6502
1.5356	0.53970 ± 0.00014	35.1458
3.0641	1.17880 ± 0.00014	38.4680
4.4289	1.70955 ± 0.00019	38.6010

* El resultado es el promedio de seis replicas con un limite de confianza del 95 %.

Tabla 41.- Resultados de cada replica en μg de Zn/ml agua.

Replica	Testigo	0.1296	0.2592	0.5173	1.5356	3.0641	4.4289
		ppm Zn					
1	0.0008	0.0019	0.0652	0.1690	0.5396	1.1787	1.7096
2	0.0005	0.0023	0.0650	0.1687	0.5398	1.1790	1.7093
3	0.0007	0.0018	0.0651	0.1691	0.5397	1.1788	1.7095
4	0.0009	0.0020	0.0649	0.1689	0.5395	1.1786	1.7094
5	0.0006	0.0017	0.0653	0.1686	0.5397	1.1789	1.7098
6	0.0008	0.0018	0.0654	0.1692	0.5399	1.1788	1.7097

En el análisis estadístico tanto en el análisis de varianza como en la prueba de Duncan si se a presentar diferencias significativas entre cada muestra y con respecto al testigo (Tablas 42 –

Tabla 42.- Estadística descriptiva de la variación del zinc en el agua.

Muestra	N	Mínimo	Máximo	Media	DE	Varianza
TESTIGO	6	0.0005	0.0009	7.16667E-04	1.47196E-04	2.167E-08
1	6	0.0017	0.0023	1.91667E-03	2.13698E-04	4.567E-08
2	6	0.0649	0.0654	6.51500E-02	1.87083E-04	3.500E-08
3	6	0.1686	0.1692	0.168917	2.31661E-04	5.367E-08
4	6	0.5395	0.5399	0.539700	1.41421E-04	2.000E-08
5	6	1.1786	1.1790	1.178800	1.41421E-04	2.000E-08
6	6	1.7093	1.7098	1.709550	1.87083E-04	3.500E-08

Tabla 43.-Análisis de varianza de la variación del zinc en el agua.

	Suma de cuadrados	Gl	Media de los cuadrados	*F
Entre grupos	16.305	6	2.718	82350326.472
Dentro de grupos	1.155E-03	35	3.300E-08	
Total	16.3038	41		

*F sacada de tablas 2.46

Tabla 44.- Análisis de Duncan de la variación del zinc en el agua.

Suma de los cuadrados del error	Media de los cuadrados del error	DE de las medias
0.0012	3.4285E-05	0.0024

Tabla 45.- Valores de r_p multiplicado por la DE de las medias

P	2	3	4	5	6	7
R_p	0.0069	0.0073	0.0075	0.0076	0.0078	0.0079

Tabla 46.- Resultados de las comparaciones entre las medias

Media de cada tratamiento	0.0007	0.0019	0.0652	0.1689	0.5397	1.1788	1.7096
0.0007							
0.0019	0.0012						
0.0652	0.0645	0.0633					
0.1689	0.1682	0.167	0.1037				
0.5397	0.539	0.5378	0.4745	0.3708			
1.1788	1.1781	1.1769	1.1136	1.0099	0.6391		
1.7096	1.7089	1.7077	1.6444	1.5407	1.1699	0.5308	

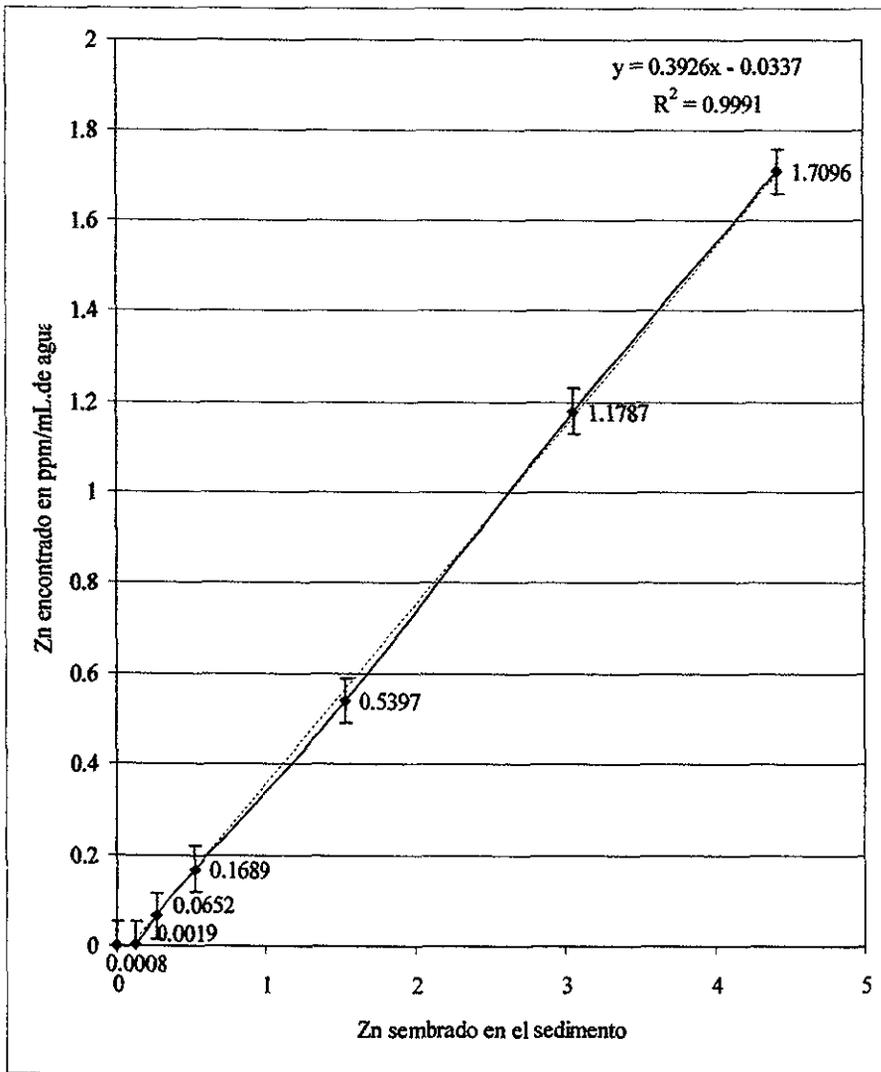


Figura 9.- Variación de la cantidad de zinc sembrado en el sedimento con respecto a la encontrada en el agua después de 96 h en el sistema de flujo continuo, su linealidad y su desviación estándar.

4.3.- En el tejido de la planaria

Se puede apreciar en la primera concentración probada de 0.1296 ppm de Zn el incremento del porcentaje de recuperación fue solo del 4 % con respecto al testigo, mientras que la segunda concentración probada (0.2592 ppm Zn) solo aumento el 1 % con respecto a la concentración anterior inmediata. En la cantidad de 0.5173 ppm de Zn aparecio un fenomeno parecido al ya mencionado en el punto 4.4.2. ya que solo aumento el 1% el porcentaje de recuperación con respecto a la concentración inferior inmediata, de esta manera entre éstas tres primeras muestras no hay un incremento desmedido. En la cuarta concentración encontrada (1.5356 ppm de Zn), la diferencia con el tratamiento anterior es ya mayor (3 %), y cada vez este incremento aumenta como se puede ver en los dos últimos casos (3.0641 y 4.4289 ppm de Zn) donde el porcentaje llegó a aumentar en un 7 % en el primer caso y un 5 % para el segundo con referencia a la concentración anterior inmediata (Tablas 47 y 48). Su comportamiento no llega a ser tan lineal como en el caso del hinc encontrado en el agua y en el sedimento, sin embargo si se llega a considerar bueno ya que su coeficiente de correlación es de 0.9642 (Figura 10).

Tabla 47.- Cuantificación del Zn en el tejido de la planaria a las 96 horas*

	Zn en µg/g tejido húmedo ± DE	% Recuperación
0 (Testigo)	0.0009 ± 0.00014	1.0212
0.1296	0.00655 ± 0.00019	5.0154
0.2592	0.01592 ± 0.00017	6.1342
0.5173	0.03875 ± 0.00019	7.4812
1.5356	0.15670 ± 0.00021	10.2044
3.0641	0.53955 ± 0.00019	17.6103
4.4289	0.98455 ± 0.00019	22.2289

* El resultado es el promedio de seis replicas con un limite de confianza del 95 %.

Tabla 48.- Resultados de cada replica en µg de zinc/g tejido húmedo.

Replica	Testigo	0.1296	0.2592	0.5173	1.5356	3.0641	4.4289
	ppm Zn	ppm Zn	ppm Zn	ppm Zn	ppm Zn	ppm Zn	ppm Zn
1	0.0009	0.0064	0.0159	0.0386	0.1567	0.5395	0.9843
2	0.0010	0.0068	0.0162	0.0388	0.1565	0.5398	0.9846
3	0.0008	0.0065	0.0157	0.0390	0.1569	0.5397	0.9848
4	0.0011	0.0066	0.0160	0.0387	0.1566	0.5393	0.9845
5	0.0007	0.0063	0.0158	0.0385	0.1570	0.5396	0.9844
6	0.0009	0.0067	0.0159	0.0389	0.1565	0.5394	0.9847

En la parte estadística se puede apreciar las diferencias significativas entre algunos casos y respecto al testigo (tablas 49 – 53).

Tabla 49.- Estadística descriptiva de la variación de zinc en el tejido de las planarias.

Muestra	N	Mínimo	Máximo	Media	DE	Varianza
TESTIGO	6	0.0007	0.0011	9.00000E-04	1.41421E-04	2.000E-08
1	6	0.0063	0.0068	6.55000E-03	1.87083E-04	3.500E-08
2	6	0.0157	0.0162	1.59167E-02	1.72240E-04	2.967E-08
3	6	0.0385	0.0390	3.87500E-02	1.87083E-04	3.500E-08
4	6	0.1565	0.1570	0.156700	2.09762E-04	4.400E-08
5	6	0.5393	0.5398	0.539550	1.87083E-04	3.500E-08
6	6	0.9843	0.9848	0.984550	1.87083E-04	3.500E-08

Tabla 50.- Análisis de varianza de la variación de zinc en el tejido de las planarias.

	Suma de cuadrados	Gl	Media de los cuadrados	F
Entre grupos	5.117	6	0.853	25548729.094
Dentro de grupos	1.168E-03	35	3.338E-08	
Total	5.1182	41		

F encontrada en tablas 2.46

Tabla 51.- Análisis de Duncan para la variación de zinc en el tejido de las planarias.

Suma de los cuadrados del error	Media de los cuadrados del error	DE de las medias
0.0012	3.4285E-05	0.0024

Tabla 52.- Valores de r_p multiplicado por la DE de las medias.

P	2	3	4	5	6	7
R_p	0.0069	0.0073	0.0075	0.0076	0.0078	0.0079

Tabla 53.- Resultados de las comparaciones entre las medias.

Media de cada tratamiento	0.0009	0.0065	0.0159	0.0388	0.1567	0.5396	0.9846
0.0009							
0.0065	0.0056						
0.0159	0.015	0.0094					
0.0388	0.0379	0.0323	0.0229				
0.1567	0.1558	0.1502	0.1408	0.1179			
0.5396	0.5387	0.5331	0.5237	0.5008	0.3829		
0.9846	0.9837	0.9781	0.9687	0.9458	0.8279	0.445	

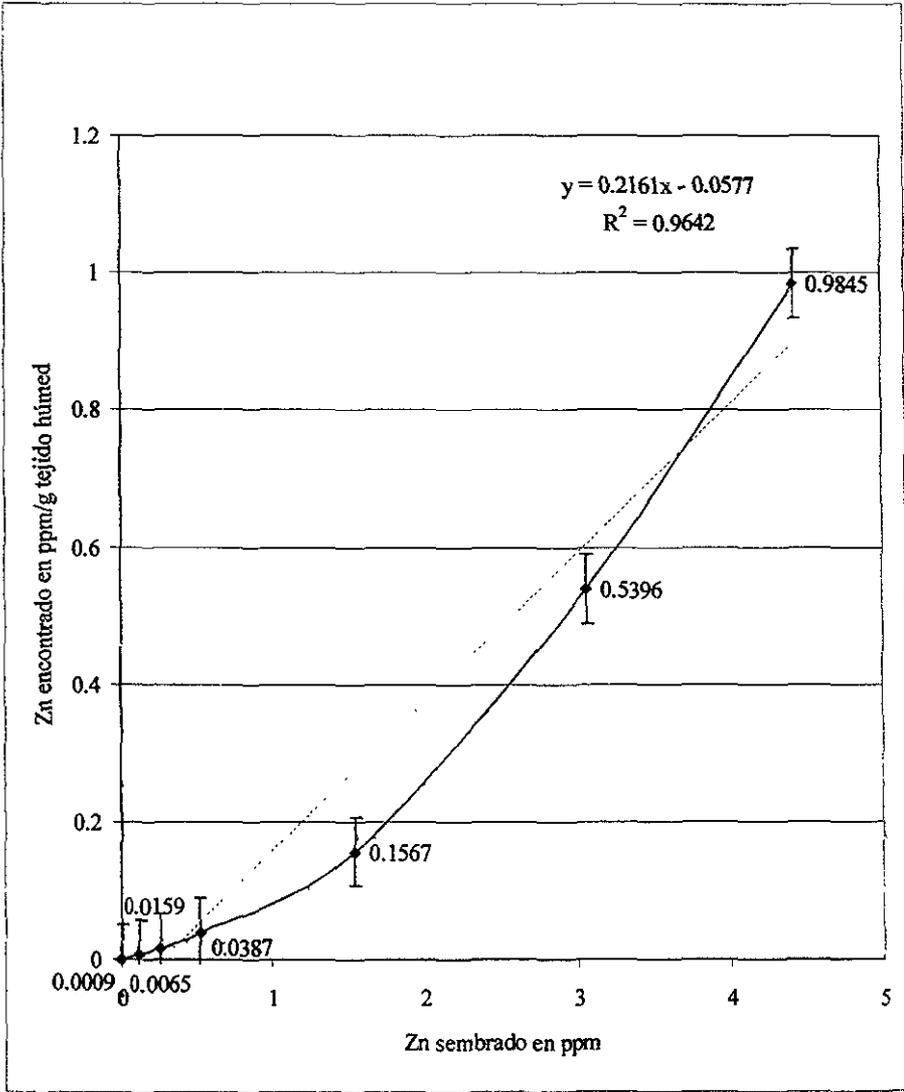


Figura 10.- Variación del zinc en el tejido de las planarias después de 96 h en el sistema de flujo continuo con su linealidad y su desviación estándar.

- Porcentajes totales de captación en el sistema a las 96 horas

Después de haber cuantificado el metal tanto en el sedimento como en el agua y en el tejido del organismo se procedió a calcular el Factor de Bioconcentración (FB). Como se ve en la Tabla 54 en la primera concentración utilizada (0.1296 ppm Zn), la mayor parte del tóxico (el 89.0432 %) se encontraba en el sedimento, mientras que una pequeña fracción se distribuía entre el agua del sistema (5 %) y los organismos (1 %). Al sembrar 0.2592 ppm de Zn en el sedimento del sistema se empiezan a modificar las condiciones ya que una mayor fracción del metal se empieza a disolver en el agua (el 25.1443 %) mientras que los organismos captan una mayor fracción (6.1342 %) con respecto a la concentración utilizada anteriormente. A partir de la tercera concentración del tóxico sembrado (0.5173 ppm Zn) el porcentaje de recuperación en el agua cambia a un 32 % mientras que en los organismos es del 7 %, en la cuarta concentración probada (1.5356 ppm Zn) el incremento del porcentaje de recuperación ya no llega a ser tan disparado ya que solo aumenta un 3 % en el agua al igual que en los animales con respecto a la concentración anterior inmediata. En el caso del sedimento su decremento no llega a ser tan acelerados, es del 9 % en este caso. En las dos últimas cantidades probadas (3.0641 y 4.4289 ppm de Zn) se ve un aumento muy pequeño en el porcentaje de recuperación tanto en el agua como en las planarias, de igual manera el porcentaje de recuperación en el sedimento llega a disminuir en proporciones muy pequeñas. En cuanto a la cantidad captada del metal por las planarias se llega a apreciar su tendencia en aumento, especialmente en la cuarta concentración probada (1.5356 ppm de Zn) donde pasa de 0.0387 a 0.1567 mg/g tejido húmedo, con el factor de bioconcentración pasa algo semejante en donde llega a incrementarse aceleradamente al pasar de 0.28 a 0.50.

En la figura 11 se puede observar claramente que conforme se incrementa las concentraciones del tóxico en el sistema se llega a presentar una mayor cantidad de este tanto en el agua como en los organismos y su concentración presente en el sedimento va disminuyendo. De hecho este fenómeno es más patente a concentraciones pequeñas del tóxico (las tres primeras concentraciones probadas). De igual manera, se ve también que la concentración que se llega a distribuir en el agua se podría pensar que se llega a saturar conforme a un aumento del tóxico.

Tabla 54.- Porcentajes de recuperación total y FB

Zn En ppm	% recuperación sedimento	% recuperación planaria	% recuperación agua	Total del % Recuperación	Cantidad Captada Mg/g tej.	% captación	FB
0.1296	89.0432	5.0154	1.4660	95.5246	0.0065	5.6326	0.06
0.2592	61.8827	6.1342	25.1443	69.4829	0.0159	9.9127	0.10
0.5173	45.3315	7.4812	32.6502	77.9570	0.0387	16.5032	0.17
1.5356	36.0575	10.2044	35.1458	78.9121	0.1567	28.3005	0.28
3.0641	35.3578	17.6103	38.4680	88.1139	0.5396	49.8062	0.50
4.4289	32.4595	22.2289	38.6010	93.1564	0.9845	68.4822	0.68

5.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Por el contenido de materia orgánica en los sedimentos de la PIR se puede considerar como un sustrato medianamente contaminado. Ésto indica la inexistencia de un exceso de derivados carbonados formados al descomponerse la materia cuantificada, en un sistema acuático esto es muy importante ya que esta puede ser una causa de la disminución de oxígeno disuelto. De igual manera el porcentaje de nitrógeno no se considera un factor crítico en las muestras, debido a que su concentración no es excesiva por lo que no utilizará el oxígeno disuelto para formar otros compuestos, algunos de ellos tóxicos para los organismos locales.

Algunas sustancias con grupos que contengan carbono y nitrógeno, presentes en cuerpos de agua, pueden modificar el pH (Allen, 1992). En el sedimento de la PIR la medición del potencial de hidrógeno fue cercano a ser neutro (7.04), esta propiedad permitirá un buen desarrollo de las especies bénticas. De hecho, para los metales este es un factor importante, ya que en el caso del Zn en ambientes ácidos llega a solubilizarse fácilmente, aumentando así su biodisponibilidad.

El tipo de partículas presentes puede determinar la capacidad de almacenamiento de los xenobióticos (Zhou, 1995). El tamaño predominante en el sedimento de la PIR corresponde al tipo de arcilla, ésto sugiere el pensar en una menor área de contacto, por tratarse de un grano grande, de esta manera será menor la cantidad que se llegue a absorber del tóxico. Esta cuantificación es muy importante debido al movimiento que podría presentar el metal en el sistema agua – sedimento. Probablemente las oportunidades para captar una molécula dafina es reducida por lo que su disponibilidad para dañar a los organismos bénticos podría ser mayor.

En la cuantificación de la concentración letal media en el agua se puede notar un incremento en el porcentaje de la mortandad a medida que aumentaba las concentraciones de Zn probadas, de hecho hay un punto crítico en la cuarta concentración (50 ppm) donde la mortandad se incrementa notablemente. En el caso del sedimento el comportamiento fue más irregular, llega a aumentar en todos los casos el porcentaje de mortandad pero en intervalos, primero llega a aumentar el 18 % con respecto a la primera concentración probada y después un 15 % con respecto a la cantidad inferior inmediata, para luego en la dosis de 50 ppm se incrementa en un 18 % y en la última dosis probada el 100 % aumento un 15 % más con respecto a la concentración inferior inmediata. De igual

manera el rango probado en el sedimento fue mucho más cerrado que en el caso del agua debido a estas irregularidades presentadas desde las pruebas preliminares.

El valor de la CL_{50} en agua fue de 13.77 ppm, siendo mayor que en sedimento cuyo valor fue de 12.52 ppm. Probablemente el tóxico al no tener en donde absorberse salvo en las pequeñas raciones adheridas a las paredes del recipiente, toda la cantidad adicionada queda biodisponible para los organismos. Si en el sedimento la CL_{50} es menor esto quiere decir que se necesita una cantidad menor del tóxico para tener este efecto, esto puede ser por el pH que tenga el mismo sedimento, la proporción de sedimento y la naturaleza del mismo; de igual manera, podría suceder en el medio natural. Estos valores se pueden comparar con otros encontrados en diversos animales como el de la almeja *Ruditapes philippinarum* (cuyo CL_{50} a las 96 horas de 16.40 mg/L)(Dai, 1997) o en el cangrejo *Chasmagnathus granulata* (cuyo CL_{50} 15.7 mg/L)(Bianchini, 1999), de esta manera se puede demostrar que los organismos bénticos son más sensibles con respecto a otros invertebrados como en estos ejemplos porque la concentración letal media en las planarias es más pequeño que el de los invertebrados, esto quiere decir que con una cantidad más pequeña del tóxico se llegan a morir la mitad de los animales de prueba (para el caso de *Dugesia*).

Las proteínas son un parámetro importante de medición del efecto tóxico del zinc. Su abundancia en los organismos, las grandes moléculas que conforman y las funciones que desempeñan son algunas de las razones de su importancia. Un ejemplo de ellas son las enzimas, responsables de llevar a cabo reacciones vitales tanto para el catabolismo como para el anabolismo. También se recuerda su papel fundamental en el proceso de duplicación y transcripción del ADN y ARN, siendo estas últimas las máximas sustancias que organizan un cuerpo (Stryer, 1995).

En este caso las proteínas totales llegaron a modificarse, aumentaron con un comportamiento lineal como se puede ver en la gráfica 5, sin embargo este incremento en las dos últimas concentraciones del metal sembrado (3.0641 y 4.4289 ppm de Zn), no se elevaron en forma proporcional, esto sugiere que al acercarse a la máxima concentración probada que corresponde a la CL_0 la capacidad de los organismos para seguir sintetizando proteínas es cada vez más deficiente por lo que su maquinaria metabólica puede verse más restringida a realizar funciones, como la desintoxicación de metales. Este último punto es muy importante debido al área de aplicación, esto

si los organismos son incapaces de desechar o reutilizar los tóxicos, se estaría ya en el borde tal, esto traería problemas no solo a nivel poblacional, como número de crías, tiempo de maduración, etc. Se podría estar hablando ya de una extinción de la especie en el ecosistema, de ahí los resultados son consistentes ya que al probar la concentración letal LC_{50} , una cantidad superior ya estaríamos con una alta probabilidad de muerte de un número de organismos.

Unas proteínas específicas, las metalotioneínas, están presentes en organismos tanto vertebrados como invertebrados. Sus funciones no solo tratan de la desintoxicación sino también del almacenamiento y la regulación metabólica de los metales. Una característica peculiar es su especificidad no solo por el Zn sino también por otros metales como el cobre, mercurio, plata y cadmio, de manera que puede controlar en cierta medida la concentración de estos en el organismo de acuerdo a las demandas de cada animal (Iszard, 1995). En este trabajo en las planarias se puede ver un incremento, de igual manera como en las proteínas, esto concuerda debido a su naturaleza. Así se puede interpretar que se llegan a sintetizar efectivamente en presencia de metales, pero su síntesis se detiene hasta que en el medio predomine una cierta cantidad de tóxicos, siendo esto el indicador que hace que se acelere su síntesis. Nuevamente en las últimas concentraciones se ve una disminución del porcentaje sintetizado de estas proteínas con respecto al valor encontrado del metal en el tejido del organismo, esto sugiere nuevamente, una limitante en el metabolismo del animal que impide su síntesis. De esta manera la acumulación de los metales esenciales llega a provocar daños a todos los sistemas, empezando con el sistema nervioso principalmente, ya que se vio un efecto tóxico que provocaba la inmovilización paulatina del animal.

Otro bioindicador importante es la cuantificación de la hemoproteína presente en el organismo de estudio, ésta al tener un centro metálico, el xenobiótico presente puede competir por ocupar este lugar, si esto sucediera la consecuencia directa se vería en la eficiencia por transportar el oxígeno (Cockerham, 1994). Como es conocido, los organismos dependen de una cierta dosis de oxígeno para poder llevar a cabo sus funciones fisiológicas. En el caso de las planarias este elemento es acarreado por la hemocianina, presente en la linfa del animal que a diferencia de los vertebrados su centro metálico es de cobre.

Así que en la hemocianina cuantificada, podemos ver un proceso contrario a las moléculas antes mencionadas, aquí se puede observar una relación inversamente proporcional entre la concentración de esta hemoproteína y el Zn sembrado (Figura 7). Se han reportado en otros experimentos una drástica disminución de los valores de la hemocianina al probar concentraciones superiores a 0.1 ppm del tóxico (Bianchini, 1999), las concentraciones de prueba utilizadas van desde 0.1296 hasta 4.4289 ppm), así que un efecto semejante se esperaba. De esta manera al probar la última concentración (4.4289 ppm), prácticamente los organismos ya no tenían la capacidad de oxigenar sus tejidos por tener una cantidad ínfima de hemocianina y las planarias al ser organismos aerobios necesitan a este elemento como molécula fundamental para poder tener un funcionamiento adecuado de la maquinaria metabólica de su cuerpo, de no tenerlo podrían llegar a condiciones letales, estos organismos como la mayoría de los animales, al ser aerobios, es necesario la presencia del gas para las actividades celulares y la realización de reacciones químicas, principalmente, de esta manera se empieza con retraso de los ciclos básicos de síntesis de macromoléculas, llegando hasta la anulación total de estos.

Así como tenemos estos bioindicadores también es importante registrar el porcentaje de recuperación en las partes que conformen el sistema, de esta manera se puede tener una idea del movimiento del metal a diferentes concentraciones, para saber si este se absorbe en el sedimento, se vuelve en el agua o los organismos son capaces de bioconcentrarlos. En este caso la cuantificación del tóxico en las partes del sistema se observarán fenómenos muy interesantes, en primer lugar examinaremos los resultados del sedimento. Aquí el porcentaje de recuperación va notoriamente disminuyendo al incrementarse la cantidad del metal sembrado en el sedimento, podemos ver en la concentración más pequeña de 0.1296 ppm realmente no hay mucha diferencia con respecto al testigo, solo un 8 %. En las siguientes concentraciones de 0.2592 y 0.5173 ppm el porcentaje de recuperación disminuye considerablemente en un 36 y 52 % con respecto al testigo. Finalmente en las últimas concentraciones de 1.5356, 3.0641 y 4.4289 ppm se ve que la disminución con respecto al testigo es considerable también ya que representa un 61, 62 y 65 % respectivamente, aunque entre ellas tres no hay diferencia considerable. De esta manera podemos considerar que el sedimento llega un momento en el que no puede liberar más Zn al medio, este último puede estar fuertemente adherido a las partículas propias del sedimento y difícilmente se puede liberar.

Se han reportado en suelos contaminados por fuentes industriales valores desde 14.6 hasta 226 ppm (Ramos, 1999). En nuestro caso los valores encontrados no son tan altos, se puede considerar entonces un lugar medianamente contaminado por este metal. Su análisis estadístico indica la existencia de diferencias significativas entre algunos tratamientos.

Con respecto al porcentaje de recuperación en el agua del sistema podemos ver que sucede un fenómeno contrario, al incrementar la siembra del tóxico en el medio, la fracción del mismo localizada en el agua es cada vez mayor. Podemos ver en la primera concentración de 0.1296 ppm, el porcentaje de recuperación en el agua no es realmente muy diferente del testigo, la diferencia es de tan solo el 1 %. En las tres concentraciones consecuentes si llega a incrementarse el porcentaje de recuperación notablemente y con respecto al testigo es del 25, 32 y 35 % para las concentraciones de 0.2592, 0.5173 y 1.5356 ppm respectivamente. En las últimas concentraciones usadas de 3.0641 y 4.4289 ppm aunque la diferencia con respecto al testigo si es grande, del 38 %, entre ellas la diferencia es despreciable.

En el valle de México se han reportado valores de la concentración del metal en agua que van desde 0.8 hasta 1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de agua (Quiroz, 1999). Estos datos son semejantes a los encontrados en este trabajo, esto nos indica congruencia en el estudio ya que la presa se sitúa precisamente en la entrada del valle. Su análisis estadístico nos indica diferencias significativas entre algunas concentraciones probadas y con respecto al testigo, esto nos implica que el tóxico efectivamente al aumentar su concentración si llega a aumentar la proporción en el agua del sistema.

En la cuantificación del Zn en el tejido de la planaria podemos ver un fenómeno parecido al del agua del sistema ya que la concentración del metal que se detecto en el organismo fue aumentando conforme aumenta la concentración sembrada del tóxico. En las tres primeras concentraciones probadas de 0.1296, 0.2592 y 0.5173 ppm la diferencia con el testigo es del 4, 5 y 6 % respectivamente que al no ser muy distintas entre ellas mismas si se observa una tendencia en aumentar cada vez. Para las últimas concentraciones de 1.5356, 3.0641 y 4.4289 ppm la diferencia si es realmente grande con respecto al testigo ya que son del 9, 16 y 21 % respectivamente.

En gusanos de tierra se han llegado a reportar valores desde 24.1 hasta 93.9 $\mu\text{g/g}$ tejido en los organismos contaminados por este metal (Ramos, 1999). En otros invertebrados como el camarón *Penaeus kroyeri* los niveles del metal acumulados son mucho mayores, van desde 50 hasta 100 $\mu\text{g/g}$ tejido (Mantelatto, 1999). En nuestro estudio la concentración encontrada en los organismos es muy pequeña es de alrededor de 1 $\mu\text{g/g}$ tejido, esto nos puede indicar que al ser las planarias los primeros organismos en la cadena alimenticia no llegan a concentrar tanto el metal como en el caso del camarón que puede llegar a biomagnificar el tóxico.

Si comparamos los porcentajes recuperados de las tres partes del sistema podemos ver que en general el sedimento empieza a perder cantidades del metal conforme estas aumentan en el sistema, por otro lado, una fracción será disuelta en el agua o será captada por el organismo, en este caso se ve que la mayor parte se va al agua, aunque en concentraciones muy pequeñas como la de 296 ppm sembrada hay una mayor proporción captada por el organismo que la disuelta en el agua, de esta manera el animal puede captar esas pequeñas cantidades y poder limpiar el agua del sistema. Esta información sugiere un equilibrio en el sistema, se podría pensar en concentraciones bajas puesto que a concentraciones menores el tóxico se libera más rápidamente del sedimento, su disponibilidad para los organismos se incrementa. A concentraciones mayores esta liberación va acelerándose y si bien es cada vez menor la fracción encontrada en el sedimento y el agua, la captación en el organismo sigue incrementándose, de aquí se puede pensar que las planarias activamente toman el metal del agua principalmente aunque no necesariamente sea esta la única vía de entrada.

Finalmente el factor de bioconcentración es un parámetro realmente importante ya que relacionado a la cadena alimenticia, si en uno de los eslabones primarios como en el caso de las planarias, se llega a acumular parte del tóxico, esta concentración se irá incrementando en cada eslabón de la cadena (Manaham, 1992). En base a los resultados anteriores, se determinó el Factor de Bioconcentración, este aumenta conforme aumenta la cantidad del tóxico sembrada en el sistema, ya que se empieza con un valor de 5.63 %, para terminar en un máximo de 68.48 %, activamente la planaria llega a captar una mayor cantidad del metal conforme el ambiente se va saturando del propio tóxico.

6.- CONCLUSIONES

Dados los resultados obtenidos y el análisis de los mismos, se puede decir que el sedimento de la PIR presenta valores de pH, porcentaje de materia orgánica y nitrógeno total dentro de un límite aceptable, así estas condiciones no representarán una variable más en los experimentos toxicológicos. Por ésto mismo el riesgo para la liberación del Zn del sedimento no se incrementará. De esta manera se pudo caracterizar el sedimento natural para poder montar los experimentos de toxicidad tanto aguda como la subletal.

La concentración letal media encontrada coincide con las reportadas por otros investigadores en invertebrados, de esta manera fue una prueba confirmatoria la realizada en el laboratorio; considerándose, por su valor, una sustancia moderadamente tóxica. La diferencia de las concentraciones letales encontradas en agua y sedimento son resultado de la capacidad de captación del metal por parte de la arcilla.

En las pruebas bioquímicas, las proteínas totales si se vieron afectadas, a mayor cantidad del tóxico su síntesis se ve incrementada. Las metalotioneínas, por ser de naturaleza proteínica, se llegó a incrementar de igual manera su síntesis al aumentar la cantidad del metal presente. La hemocianina, en cambio, se ve disminuída al aumentar el xenobiótico presente en el sistema, la consecuencia se vería reflejada en el crecimiento y la producción de los organismos. De esta manera, estos tres parámetros bioquímicos al variar significativamente, se pueden considerar bioindicadores para la evaluación del tóxico de prueba. Realizando estas pruebas bioquímicas que nos indican factores claves para el organismo de estudio, se puede tener una visión más amplia del impacto del tóxico no solo a nivel agudo sino también a nivel subletal, de esta manera se puede saber si las planarias pueden soportar cierta cantidad del tóxico sin que les llegue a afectar en sus funciones vitales.

En la cuantificación del Zn en el sistema se vio tanto en el agua como en los organismos, una relación en el mismo sentido, al aumentar la concentración total del tóxico, su presencia en estas partes del sistema también se incrementaban. De esta manera se tiene una idea del flujo del tóxico con respecto a su concentración ya que en el sistema natural se llegan a incrementar las concentraciones dependiendo de las deposiciones que la industria realice.

Sin embargo, en el sedimento, la relación fue exactamente la contraria. Por ésto, el factor de concentración de las planarias, se incrementó conforme la concentración de tóxico en el ambiente, de manera que, se pueden considerar como un organismo bioremediador. Esto es de suma importancia ya que al ser las planarias organismos naturales de la PIR se puede lograr estimular esta acción para que llegue a disminuir la concentración total del tóxico en el lugar. Además las planarias juegan un rol importante en la comunidad acuática ya que al ser estos productores secundarios son ingeridos por animales superiores que pueden ir biomagnificando el zinc, de manera que al incrementar la población total de planarias este efecto se vería atenuado.

Finalmente se propone, se continúe evaluando otras respuestas bioquímicas como la actividad de enzimas, para tener un conocimiento más profundo del daño causado. Así mismo se debería de investigar como se interrelaciona este animal con otros hidrobiontes propios del lugar en el microecosistema, de esta manera se evaluará el impacto del tóxico en todo un sistema no solo a nivel de individuo sino a nivel de comunidad y población para poder utilizarlo en programas de bioremediación. Se podría también considerar otros sitios de muestreo ya que dependiendo del sitio de descarga, la profundidad de la toma de muestra, el período del año de la toma de muestra entre otros factores varía el efecto tóxico ya que la concentración del metal puede variar considerablemente.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar,R. (1991). "A rapid method for organic quantification in sediment". *Environ.Sci.technol.* **21**. 2134 – 2139.
- Albumaizar,R.J. (1999). "Heavy metal contaminants removal by soil washing". *J.Hazrd. Mat.* **70**. 71 – 86.
- Allen ,B.G. (1992). "Sediment toxicity evaluations". *Environ. Sci. technol.* **26**. 2068 – 2075.
- APHA, AWWA, WEF. (1995). Standard methods for examination of water and wastewater. 19 ° Ed. New York. Pp. 3-1, 3-107.
- Barceloux,D.G. (1999). "Zinc". *J. Tox. Clin Tox.* **37**. 279 – 292.
- Barnes,R.D. (1977). Zoología de los invertebrados. 3° Ed. México. Interamericana. pp.139 – 159.
- Bauman,J.W. (1991). "Increase in metallothionein produced by chemicals that induce oxidative stress". *Tox.Appl.Pharm.* **110**. 347 – 354.
- Berglund,R. (1984). "Toxic effect of Zinc in aquatic animals". *Bull.Environ.Contam. Toxicol.* **33**. 63 – 68.
- Bernet,D. (1999). "Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution". *J.Fish.Diseas.* **22**. 25 – 34.
- Bianchini,A. (1999). "Effects of Zinc exposure on oxygen consumption and gill Na⁺,K⁺ - ATPase of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*". *Bull. Environ. Contam.Toxicol.* **62**. 63 – 69.
- Biz. 26 mayo 2000. <http://biz.yahoo.com/bv/000515/layfieldr.html>.
- Bradford,M. (1976). "A new rapid method for protein cuantification". *Anal. Biochem.* **72**. 248 – 254.
- Britannica Online. Encyclopoedia Britannica. 21 febrero 2000. <http://www.eb.com/>.
- Brown,S.S. (1987). Toxicology of Metals : Clinical and Experimental Research. Inglaterra. Ellis Horwood Limited. pp. 32 – 44.
- Budavari, S. Ed. (1996). The Merck Index. 12 ° Ed. EUA. Merck & Co. Inc. pp.1732–1733.

- Cervantes, C. (1999). Contaminación ambiental por metales pesados. México. AGT Editores. pp. 12 - 20.
- Chang,L.W. (1996). Toxicology of Metals. EUA. CRC. pp. 272, 290, 566 – 567.
- Cockerham,L.G. Ed. (1994). Basic environmental toxicology. EUA. CRC Press. pp. 109 –132.
- Coleman, J.E. (1998). “Zinc enzymes”. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 222 – 234.
- Dai,J. (1997). “Accumulation of Lead and Zinc and effects on activities of Catalase and GPT in the clam *Ruditapes philippinarum*”. *Tox. Appl. Pharm.* **67**. 45 – 52.
- Deng,D.X. (1999). “Increasead radiation – induced apoptosis in mouse thymus in the absence of metallothionein”. *Toxicol.* **134**. 39 – 49.
- Eaton,D.L. (1982). “Evaluation of the Cd/Hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues”. *Tox. Appl. Pharm.* **66**. 134 – 142.
- EPA (Enviromental Protection Agency). Office for Water Regulation and Standards, Criteria and Standard Division. (1980). Ambient water quality criteria for Zinc. Publication 440/5/80/079. EPA. Washington,D.C.
- Foulkes,E.C. (1990). Biological effects of heavy metals. Vol. II. Washington. CRC. pp. 173–187.
- Galloway,J.N. (1982). “Metals in the atmosphere, a simple cuantification” *Atmos. Environ.* **16**. 1677 – 1700.
- Ghiretti,A. (1973). “Identification of haemocyanin in the cyanocytes of *Carcinus maenas*”. *Exper.* **29**. 1265 – 1267.
- Giesler,E. (1983). Ulmans Encyklopädie der technishen Chemie. 4 ° Ed. Praga. Vol 24. pp.633–640.
- Hill,R.W. (1980). Fisiología animal y comparada. España. Reverté. pp. 456 – 459.
- Hymann,L.H. (1951). The invertebrates : platyhelminthes and rynchocoella. Vol. II. McGraw-Hill. pp. 66 – 219.
- Hymann,L.H. (1979). Fresh-water biology. USA. 2° ed. Edmonson. pp. 326 –330.
- INEGI.(1999). Anuario estadístico por entidad federativa. México. pp. 342.
- Iszard,M. (1995). “Effect of several metallothionein inducers on oxidative stress defense mechanisms in rats”. *Toxicol.* **104**. 25 – 33.

- Kägi, J.H.R. (1988). "Biochemistry of metallothionein". *Biochem.* 27. 23. 8509 – 8515.
- Kaim, W. (1994). Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life. London. Wiley and Sons. pp. 242 – 266.
- Kemmer, F.N. (1979). The nalco water handbook. Washington. Nalco Chemical Company. pp. 6–17, 6-13.
- Kendrick, M.J. (1992). Metals in biological systems. London, Ellis Horwood Limited. pp. 142 – 149.
- Koren, H. (1991). Handbook of environmental health and safety. Principles and practices. Vol I. 2° Ed. New York. Lewis Publishers. pp. 110, 251.
- Kramarz, P. (1999). "Dynamics of accumulation and decontamination of Cadmio and Zinc in carnivorous invertebrates. The ground beetle, *Poecilus cupreus*". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63. 531 – 537.
- Krishnamurthy, S. (1992). "Biomethylation and enviromental transport of metals". *J. Chem. Ed.* 69. 347 – 350.
- Lindeman, R.D. (1980). "Growth in humans, the role of enzymes". *Miner. Electrolyte. Metab.* 3. 226 – 236.
- López – González, A. (1999). "Tolerance of some mediterranean crops to Copper and Zinc : implications in toxic metal clean up". *Chem. Ecol.* 134 – 139.
- Maham, L.K. (1995). Nutrición y dietoterapia. 8° Ed. México. Interamericana McGraw – Hill. pp.123 – 126.
- Manaham, S.E. (1992). Toxicological Chemistry. 2° Ed. New York. Academic Press, Inc. pp. 135 – 160.
- Mance, G. (1990). Pollution threat of heavy metals in aquatic environments. London. Elsevier Applied Science. Pp. 9 – 21.
- Mantelatto, F.M.L. (1999). "Heavy metals in the shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* from Ubatuba bay, Sao Paulo, Brazil". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62. 152 – 159.
- Marshall, A.I. (1985). Zoología de los invertebrados. Barcelona. Reverté. pp. 209 – 213.
- Martínez-Tabche, L. (1994). "Parathion effect on acetylcholinesterase from fish through an artificial trophic chain: *Ankistrodesmus falcatus-Moina macrocopa-Oreochromis hornorum*". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52. 360-366.

- Martínez-Tabche, L. (1997). "Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in IRD". *Ecotox. Environ. Safety*. **38**, 53 – 62.
- Martínez-Tabche, L. (1999). "Toxic effect of Nickel on hemoglobin concentration of *Linodrilus Hoffismeri* in spike sediments of trout farms". *Ecotox. Environ. Safety*. **38**, 53 – 62.
- McDowell, L.R. (1992). Minerals in animals and human nutrition. New York. Academic Press. pp. 265 – 293.
- Merian, E. (1991). Metals and their compounds in the environment. Praga. VCH. pp. 1309 – 1342.
- Miller, I. (1992). Probabilidad y estadística para ingenieros. México. 4° ed. Prentice-Hall. pp. 386 – 438.
- Nava, S. (1996). "Niveles de contaminación orgánica en suelos agrícolas". *Rev. Mex. Gan. Agri*. **45**, 34 – 40.
- Ono, S. (1997). "Regional brain distribution of metallothionein, Zinc and Copper in toxic milk mutant and transgenic mice". *Toxicol.* **124**, 1 – 10.
- Phycology. 8 mayo 2000. <http://phycology.okstate.edu/faculty/abramson/plan.html>.
- Platyhelminthes lesson. 4 julio 2000. http://sun.kent.wednet.edu/starr/rivnch/sci_class/chap13.
- Prasad, A. Ed. (1993). Essential and toxic trace elements in human health and disease. New York. Wiley. pp. 33 – 45.
- Quiroz, A. (1999). "Fractioning of Cu, Mn, Zn and Pb in mineral soils along an oak forest vegetation gradient in Mexico City". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **62**, 138 – 143.
- Ramos, L. (1999) "Heavy metal pollution in water, sediments and earthworms from the Ebro River, Spain". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **63**, 305 – 311.
- Redmon, J.R. (1955). "The respiratory function of haemocyanin in Crustacea". *J. Cell. Comp. Physiol.* **46**, 209 – 247.
- Remark, R. (1989). Fresh water invertebrates of the USA. 3° Ed. New York. John and Wiley sons Inc. pp. 124 – 151.
- Scheuhammer, A.M. y Cherian, M.G. (1986). "Quantification of metallothioneins by Silver-saturation method". *Tox. Appl. Pharm.* **82**, 417-425.
- Sciencelander. 3 Abril 2000. http://www.science.lander.edu/rsfox_dugesia.html.

- SEMARNAP.(1999). Anuario estadístico de Pesca. México. p. 18.
- Smith,E.N. (1973). "Laboratory cares of invertebral animals " *Curr.Opin.Chem.Biol.* **10**. 1-8.
- Soar,W.H. (1978). Fisiología general y comparada. Barcelona. Omega. pp. 429 – 430.
- Starr,C. (1992). Biology. 7° Ed. New York. Jonh and Wiley sons Inc. pp.414 – 418.
- Stock,H.S. (1981). Química ambiental. Barcelona. Blume. pp. 161, 258 – 297.
- Stryer,L. (1995). Bioquímica. Cuarta Ed. Madrid. Reverté. Pp. 17 - 23.
- Templeton,D.M. (1991). "Toxicological significance of metallothionein". *Met.Enzim.* **205**. 11-24.
- Thorp,J.H. (1991). Ecology and classification of north american freshwater invertebrates. New York. Academic Press, Inc. p.911.
- Travieso,L. (1999). "Heavy metal removal by microalgae". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **62**. 144-151.
- Vijayakumari,P. (1987). "Acute toxicity to endosulfan to crab: effect on transport property of haemocyanin". *Bull.Environ.Contam.Toxicol.* **38**. 742 – 747.
- Ville,C. (1977). Biología. 7° Ed. México. Interamericana. pp. 339 – 341.
- Weber,C.I. Ed. (1991). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 4° Ed. New York.EPA. pp. 8 – 12.
- Wenworth, L. (1970). " A sediment evaluation in a North England lake". *Chem. Ecol.* enero. 114 – 119.
- Zhou,X.D. (1995). " Heavy metal ion adsoption on sediments of the Weiho and Hanjang rivers, China". *J. environ. Hydro.* **3**. No.2.

APÉNDICE

1.- Preparación de reactivos.

- ❖ Amortiguador Trizma pH 7 : en 1 L se vertieron 8.1816 g de NaCl, 0.4473 g de KCl y 0.4840 g de Trizma base, se llevo a volumen con agua desionizada.
- ❖ Reactivo de Bradford : Se disolvió 0.1000 g de azul de cumassie en 50 mL de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ al 95 % y 100 mL de H_3PO_4 , se llevo a volumen de 1 L.
- ❖ Solución de albumina de 1000 ppm : Se disolvió 0.1000 g de albumina en un matraz aforado de 100 mL, se llevo con agua deionizada a volumen.
- ❖ Solución al 1.5 por ciento de KCl : Se peso 1.5000 g de KCl y se disolvió en 100 mL.
- ❖ Solución de 1.15 por ciento de KCl : Se peso 1.1500 g de KCl y se disolvió en 100 mL de agua desionizada.
- ❖ Amortiguador Trizma HCl 30 mM pH 8 : se disolvió 0.2940 g de CaCl y 0.9680 g de Trizma en agua y se ajusto a pH 8.0 con una solución 1 M de HCl, se llevo a volumen de 1 L con agua desionizada.
- ❖ Amortiguador de glicina 0.5 M pH 8.5 : se disolvió 0.3800 g de glicina y 0.2900 g de NaCl en agua hasta un volumen de 50 mL, se agrego 50 mL de la solución 0.1 M de NaOH y se ajusto el pH.
- ❖ Estándar de Plata de 1000 ppm : se uso estándar comercial.
- ❖ Estándar de cobre de 1000 ppm : se pesó 1.0000 g de Cobre metálico y se disolvió en la mínima cantidad de HNO_3 (al 50 %), se llevo a volumen de 1 L con agua desionizada.
- ❖ Estándar de Zinc de 1000 ppm : se pesó 1.0000 g de Zn metálico y se disolvió en 40 mL de HCl (al 50 %), se llevo a volumen de 1 L con agua desionizada.
- ❖ Muestra digestora : Se pesaron 6.000 g de Selenio, 0.5030 g de $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 17.0000 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$.
- ❖ Indicador de Wesselow : Se pesaron 1.2500 g de rojo de metilo y 0.8250 g de azul de metileno, se disolvieron en 1 L con $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (al 90 %).
- ❖ Agua semidura : se pesaron 96 mg/L de NaHCO_3 , 60 mg/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 4 mg/L de KCl, se disolvieron en 19 L de agua deionizada, se dejo la mezcla en aereación por una noche y se adicionó 60 mg/L de $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, disueltos previamente en 1 L de agua deionizada.